



***Plaisir et douleur :
l'infinité de la création de nouvelles molécules***

Bernard P. ROQUES

***Professeur Emérite
Université Paris Descartes***



Ce qui caractérise les êtres vivants, c'est l'échange d'informations intracellulaire et intercellulaire conduisant à un dialogue harmonieux (homéostasie) et donnant un fonctionnement adéquat de l'organisme.

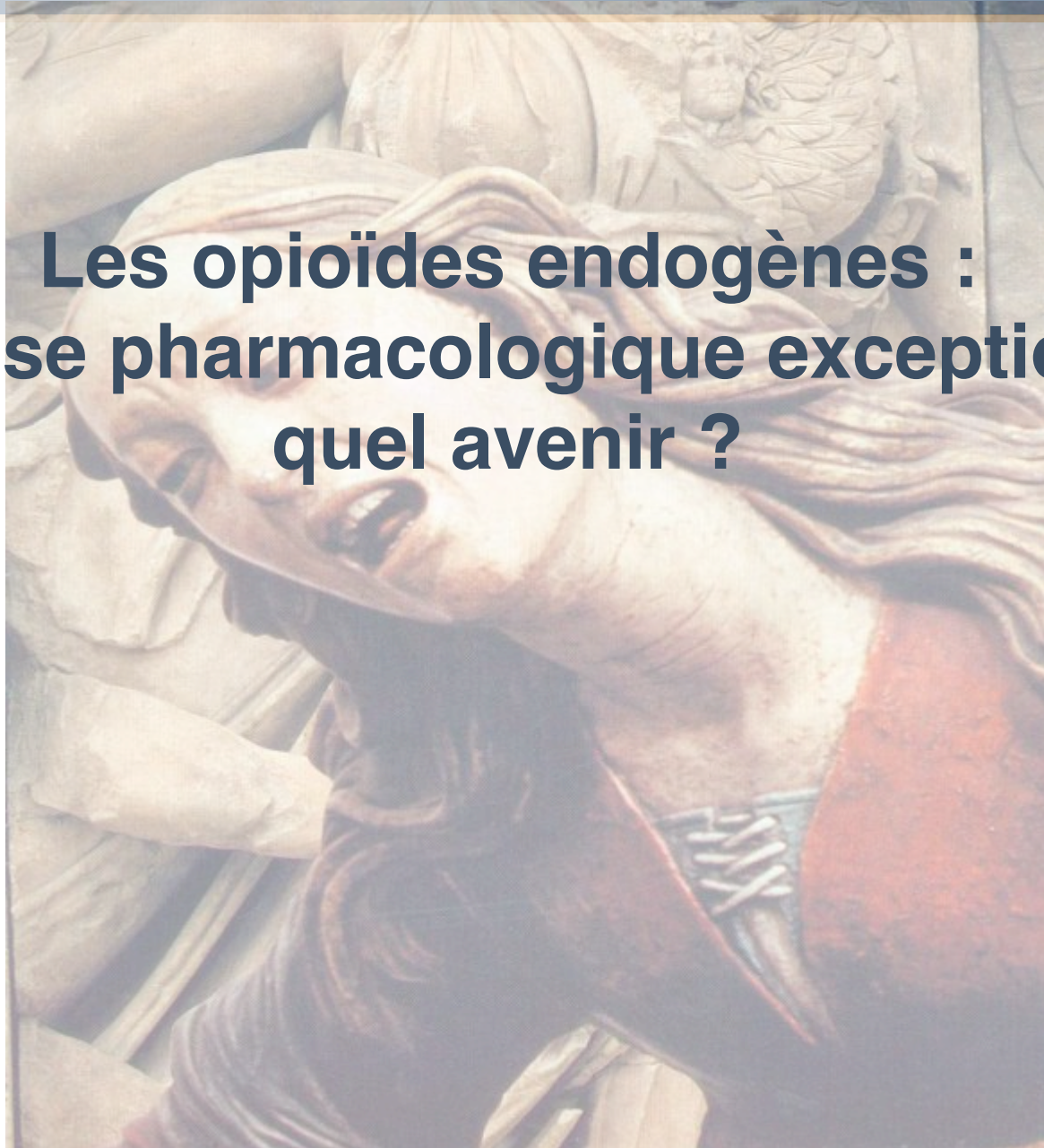
La pharmacologie a comme objet de caractériser le(s) maillon(s) défectueux de la voie de transfert d'information et ensuite de les restaurer. Le plus souvent à l'aide de molécules chimiques (médicament).

Etapes :

- Génétique***
- Biochimique***
- Structurale (RMN, masse, etc)***
- Chimique***
- Pharmacologique in vitro (affinités, inhibition, etc) puis in vivo (essais sur animaux)***
- Essais cliniques***



**Les opioïdes endogènes :
une classe pharmacologique exceptionnelle,
quel avenir ?**



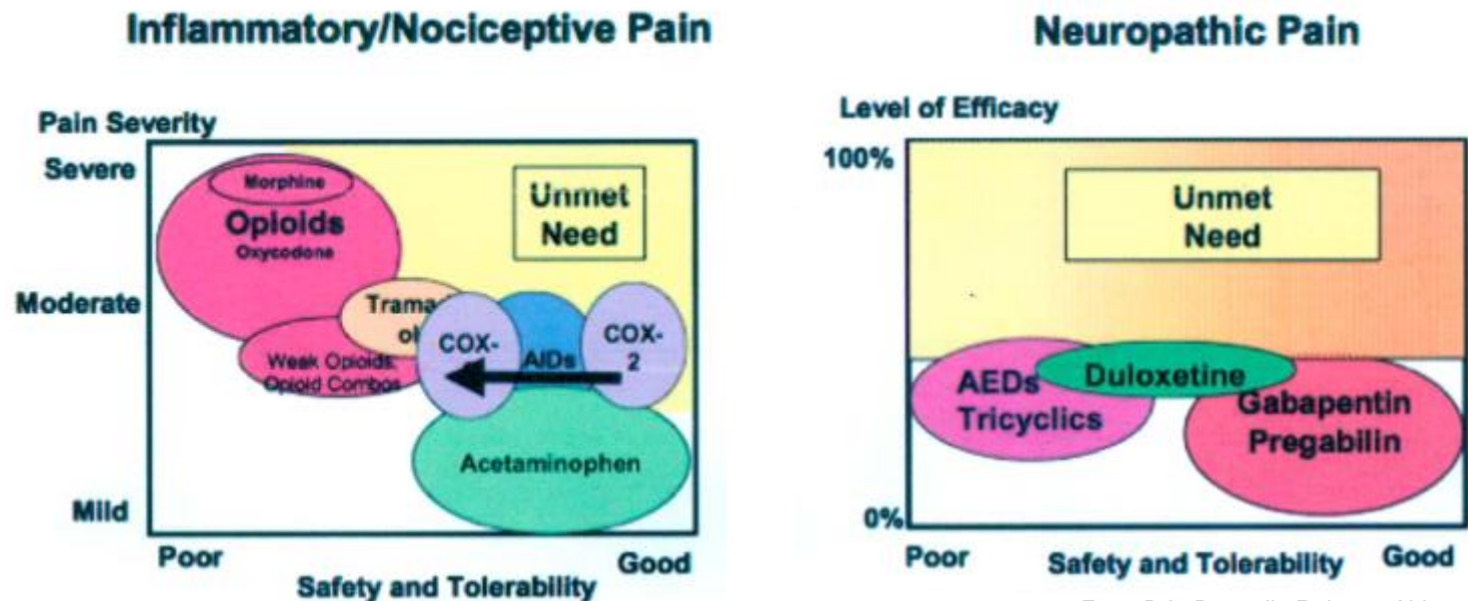


La suppression de la douleur : un objectif loin d'être atteint ...

Depuis des décennies aucun analgésique innovant aussi puissant que la morphine mais dépourvu de ses effets indésirables majeurs n'a été mis sur le marché.

Le besoin de nouveaux analgésiques est urgent aussi bien pour traiter les douleurs aiguës permanentes (cancers, accidents graves, etc) que les douleurs neuropathiques (allodynie, hyperalgésie) dues à des lésions ou affections les produisant au niveau des terminaisons et fibres périphériques avec projection centrale.

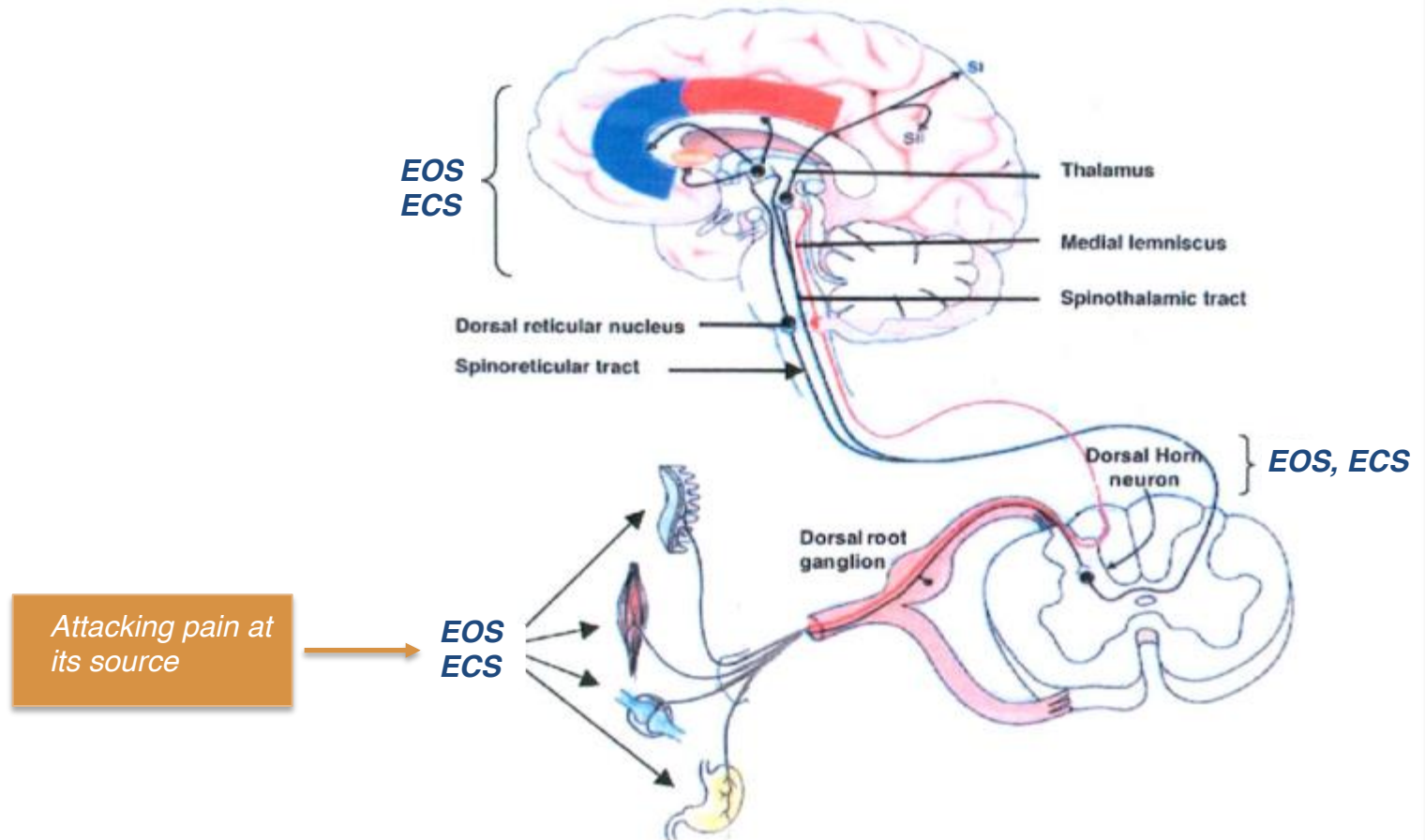
Pas de traitement réellement efficace, nombreux effets secondaires pour les anticonvulsivants et les antidépresseurs.



From D.L. Donnelly-Roberts, Abbott Laboratories.

La découverte des récepteurs opioïdes et de leurs agonistes endogènes, les enképhalines, avait laissé espérer le développement d'une « endomorphine idéale » ... !
Les raisons de l'échec, les moyens de le surmonter.

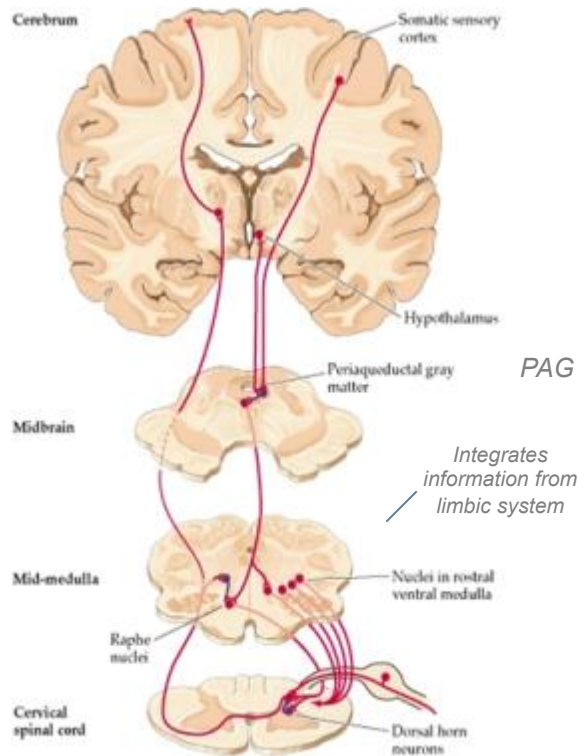
Three levels of pain control by endogenous opioid system (EOS) and endogenous cannabinoids system (ECS)



- **Relieving or reducing pain at its source**
- **More than 50% of MO effects are attributable to peripheral neurons (nociceptors)**

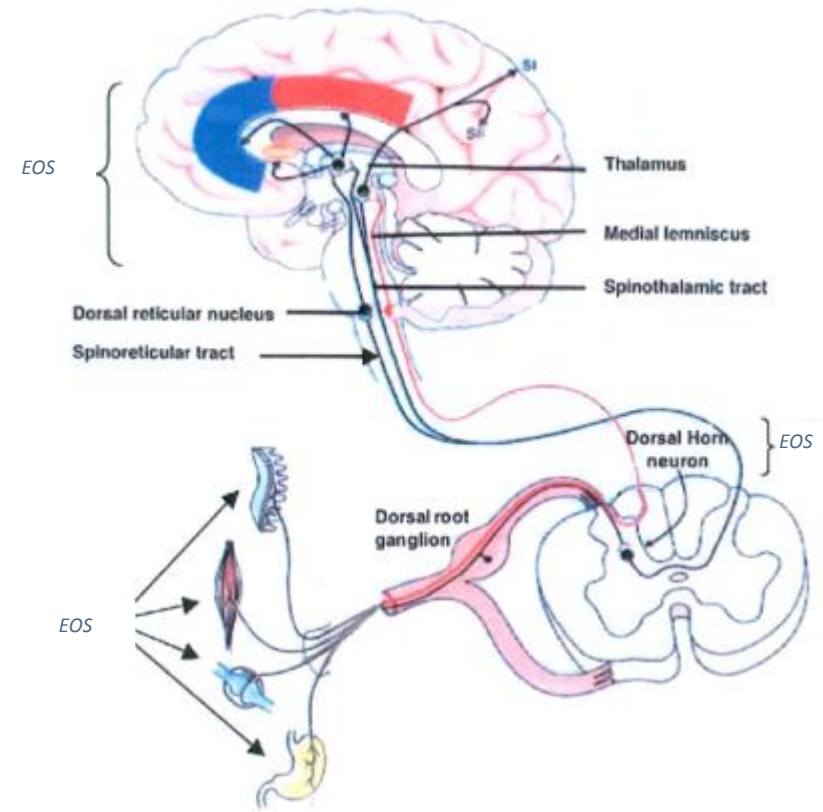
Signalisation opioïde endogène

Le système limbique et les structures cérébrales impliquées dans la mémoire, la peur, l'anxiété, etc, prennent en compte l'état émotionnel et le souvenir des sensations antérieures



Descending systems
(serotonine, nor-adrenaline)

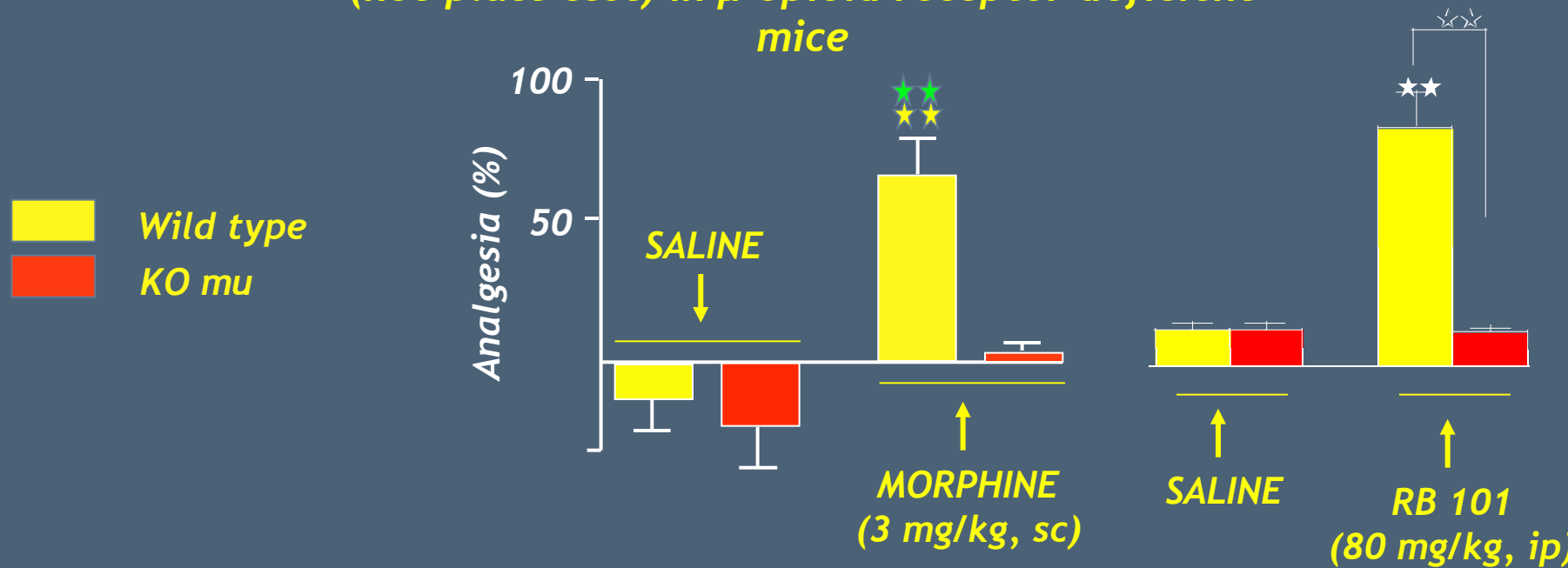
Central sensory-discriminative network (quality, intensity, location of the noxious stimulus, emotional context)



C'est le système nerveux périphérique qui génère le signal initial qui sera perçu par le cerveau comme douloureux. Il représente donc une cible particulièrement intéressante pour le développement de nouveaux analgésiques.

Mutant mice lacking the mu-opioid receptor

Lack of morphine-and RB 101-induced analgesia (hot-plate test) in μ -opioid receptor deficient mice



- Absence of morphine-induced analgesia
- Absence of morphine rewarding properties
- Chronic morphine did not produce dependence

De l'opium aux opioïdes endogènes. Pharmacochimie et physiopharmacologie.

Après des siècles d'utilisation empirique de l'opium comme analgésique et sédatif, le mécanisme d'action de son principe actif, la morphine, a enfin été décrypté à l'échelle moléculaire dans les années 1973-1995.

- Le soupçon d'équivalent endogène (*naloxone, stimulations*).
- Les cibles (*récepteurs*) et leur pluralité.
- Les agonistes endogènes ... des *neuropeptides*.
- La régulation de la messagerie (*libération, interruption enzymatique*).
- Le clonage des récepteurs et leur invalidation.



**Quelles ont été les conséquences de ces découvertes en terme de médicament ?
Que peut-on en attendre ?**

Effets-doses des opiacés exogènes

Effets généraux :

- Immunodépresseur

Effets périphériques

- Analgésie (neuropathie, inflammation)
- Centre oculomoteur (mydriase)

→ Contraction muscles lisses, estomac, intestin.
→ Constipation.

→ Blocage des muscles des sphincters.

Morphine



Effets centraux positifs majeurs :

Analgésie.
Sensation bien-être

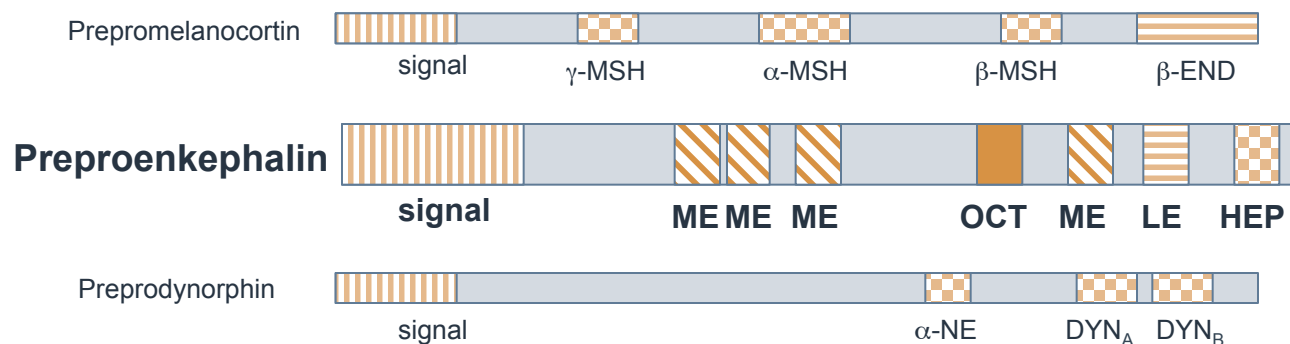
Effets centraux ± négatifs.

Respiration (dépression)
Cardiaque (rythme)
Nausée (vomissements)

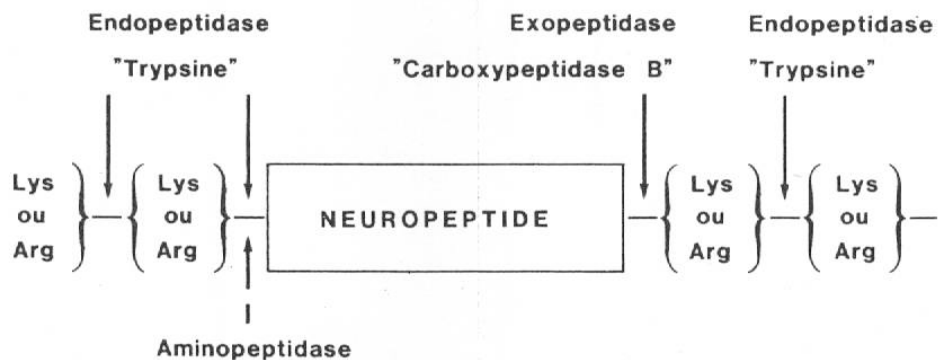
Hyperalgésie.

Tous ces effets sont-ils reproduits par les opioïdes endogènes ?

Structure of the prepromelanocortin, preproenkephalin and preprodynorphin.



Tyr-Gly-Gly-Phe-Met(Leu) ; Met(Leu)-enkephalins



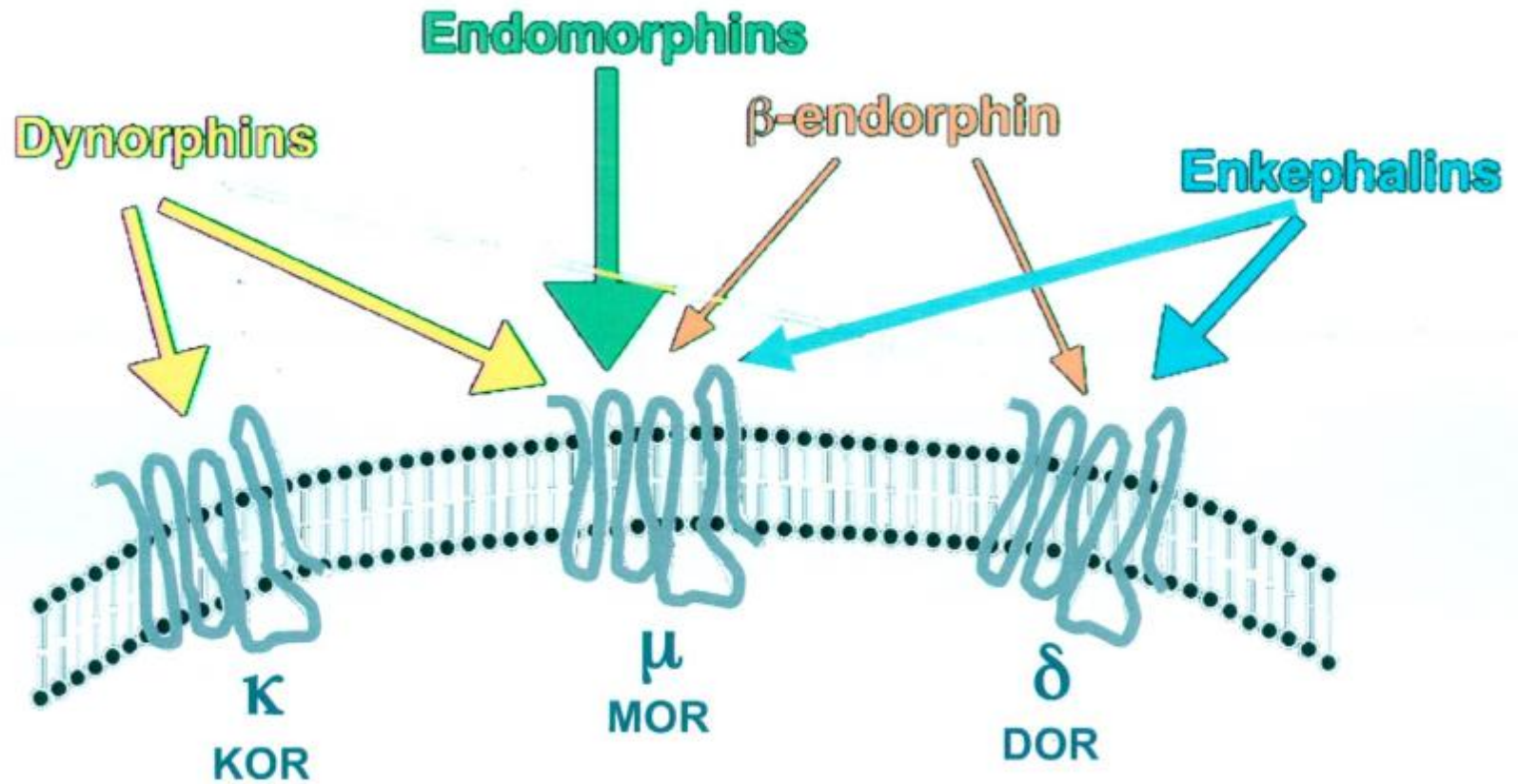
Processing (maturation) of Prepro-endorphins.

Table 1. Regional distribution of [Met^5]enkephalin and α -neoendorphin in the rat brain. (GIRAUD et al. 1983)

Region	[Met^5]enkephalin	α -Neoendorphin
Cortex	302 \pm 64	15 \pm 2.4
Striatum	3656 \pm 496	127 \pm 15
Hippocampus	469 \pm 46	91 \pm 15
Hypothalamus	2169 \pm 426	91 \pm 9
Medulla/pons	986 \pm 214	24.8 \pm 4.5
Cerebellum	66 \pm 17	3 \pm 0.6
Spinal cord	752 \pm 64	22.9 \pm 1.6

Results are expressed as picomoles per gram tissue, wet weight. All values (radioimmunoassay) are means \pm SEM for five animals.

Endorphins and their receptors.



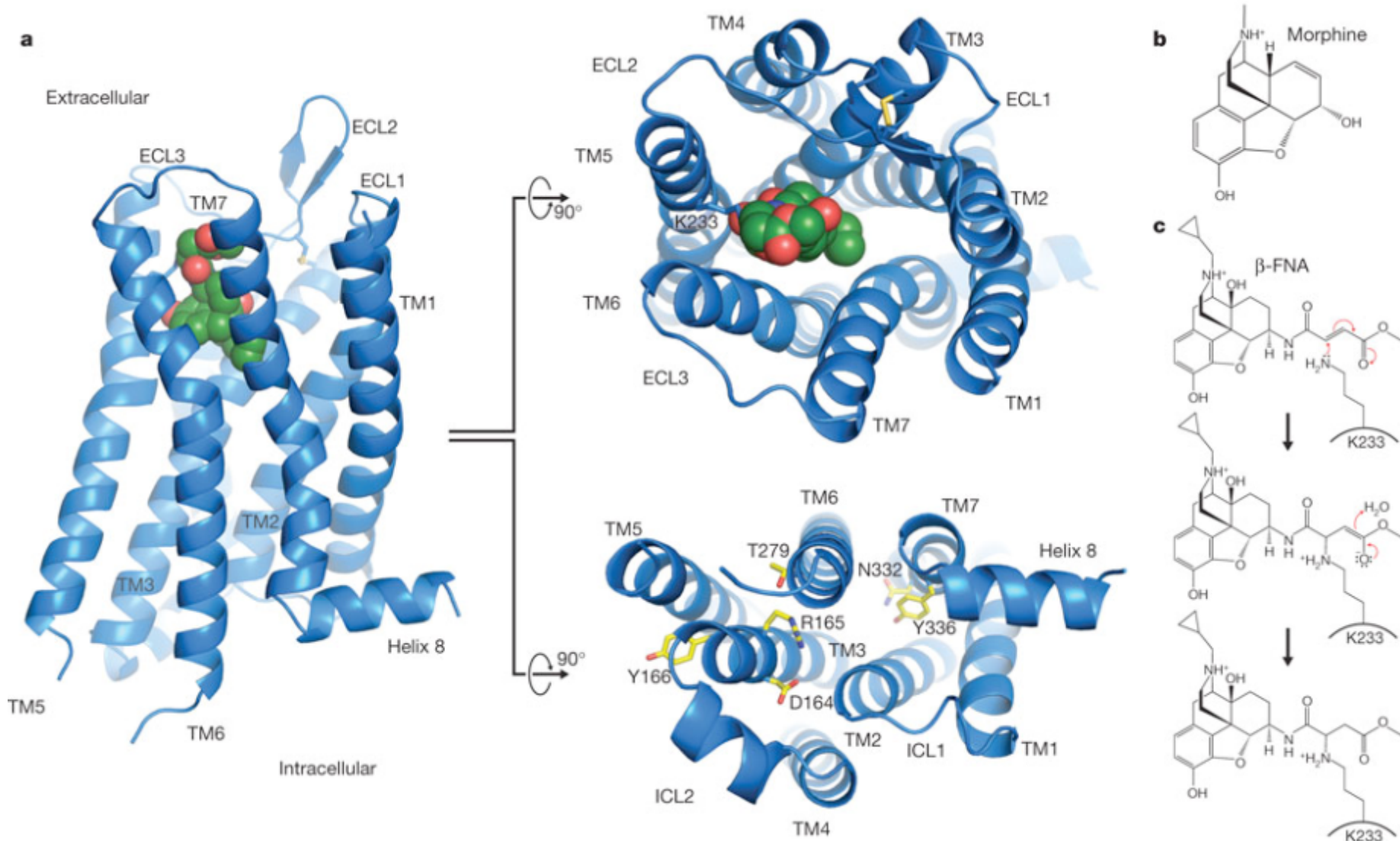
Endomorphin-1

Endomorphin-2

Tyr – Pro – Trp – Phe – NH₂

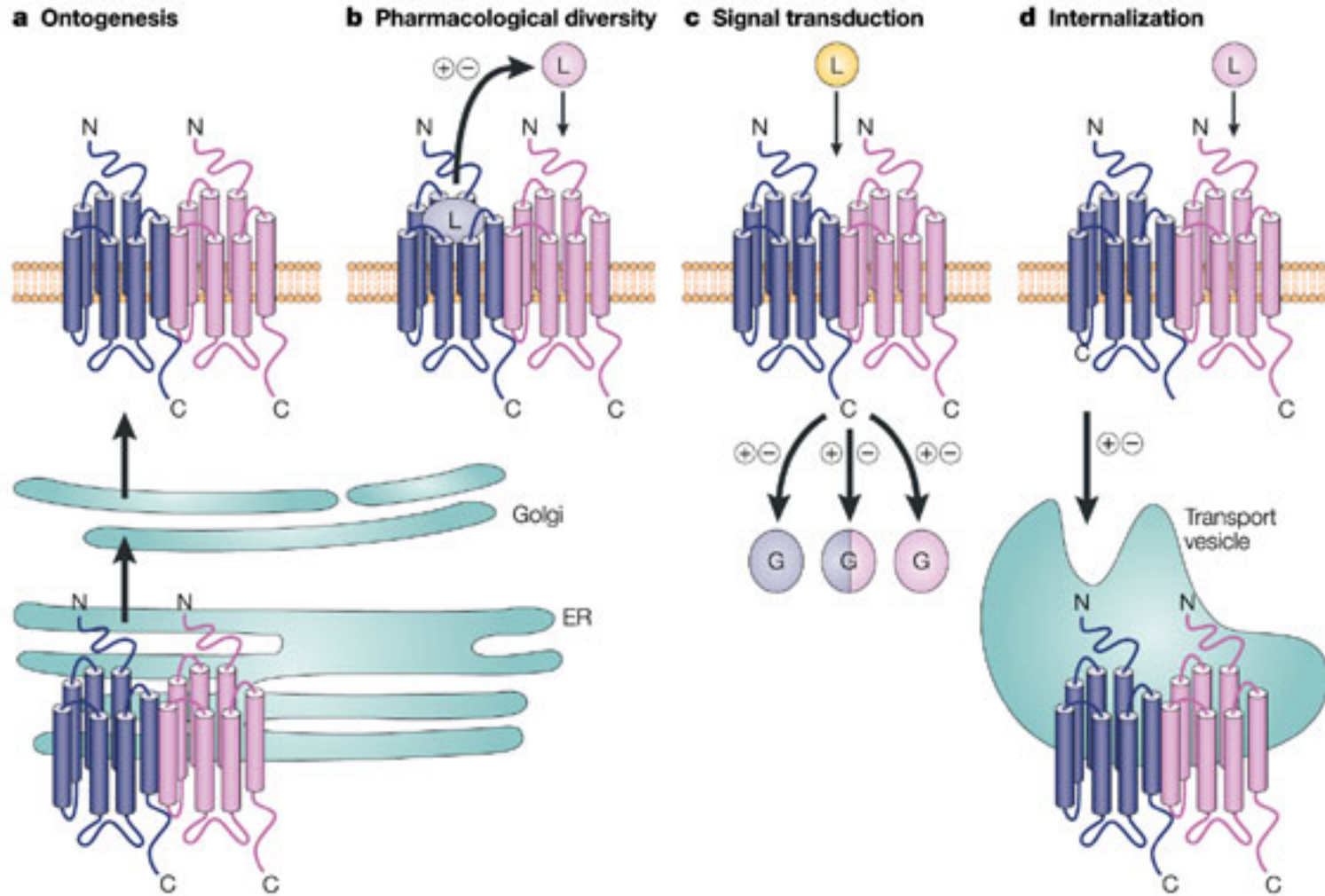
Tyr – Pro – Phe – Phe – NH₂

Structure cristallographique des récepteurs μ (MOR)

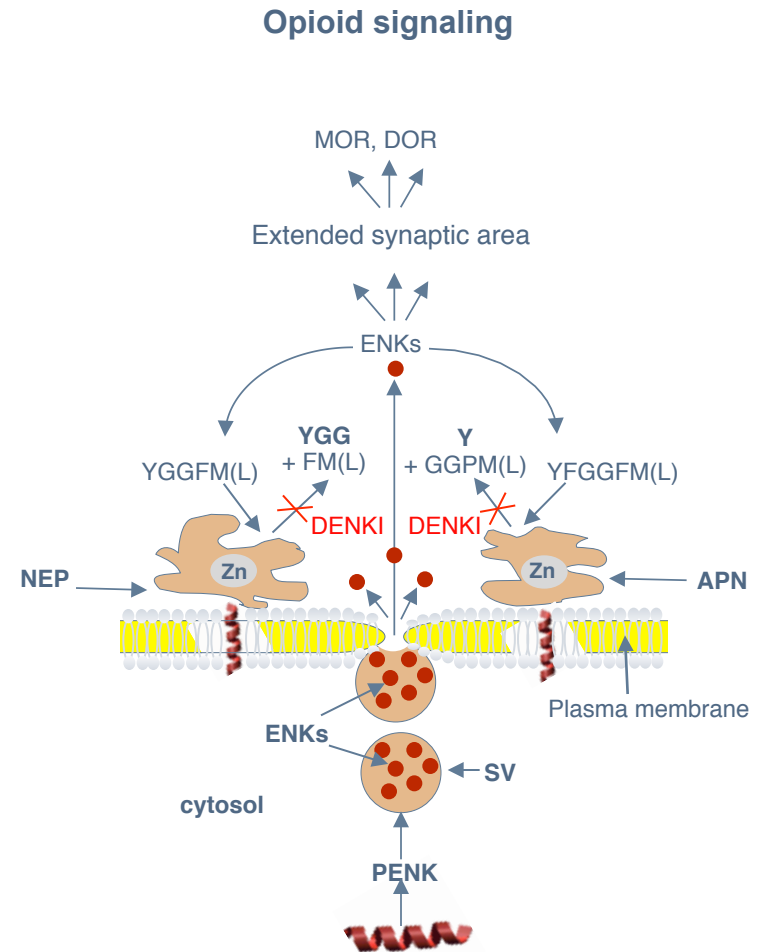
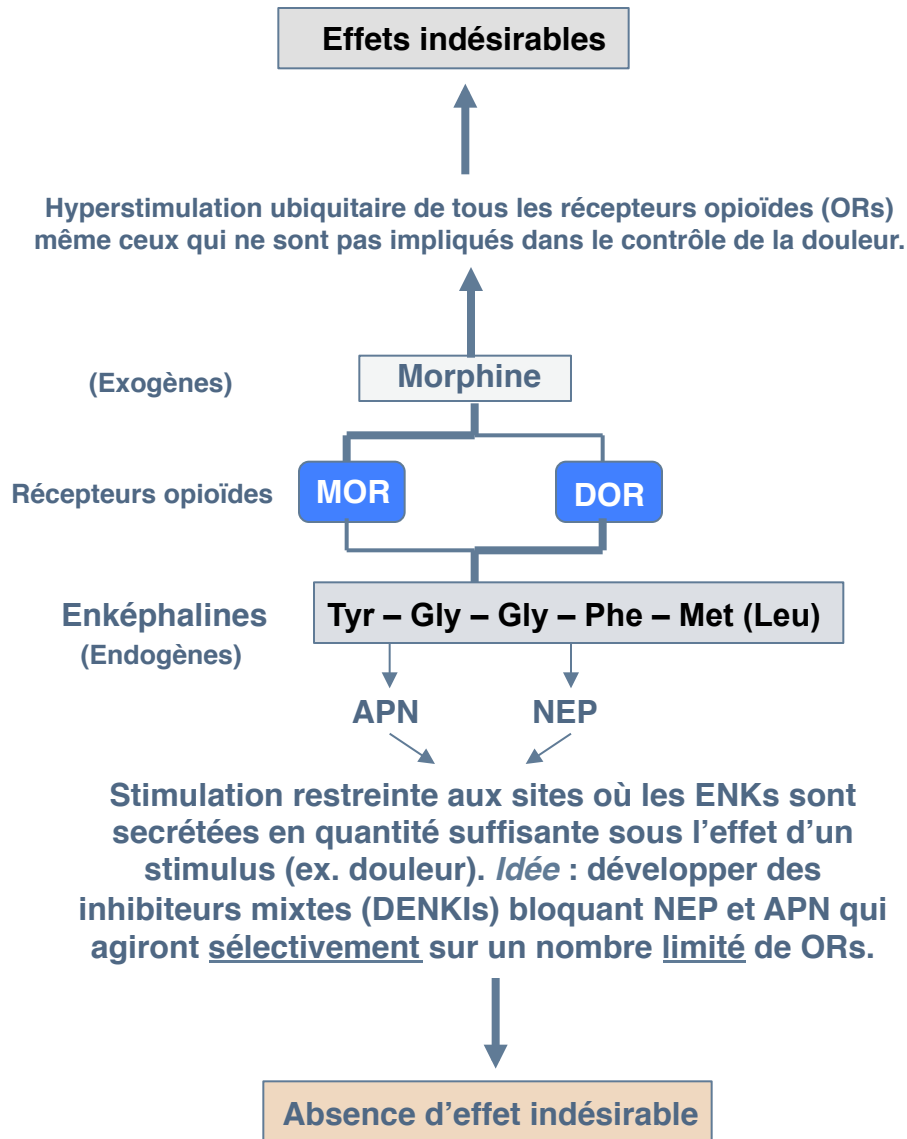


Aashish Manglik¹, Andrew C. Kruse¹, Tong Sun Kobilka¹, Foon Sun Thian¹, Jesper M. Mathiesen¹ & Sébastien Granier *Nature* 2012

Proposed roles for GPCR homo- or hetero-dimerization.



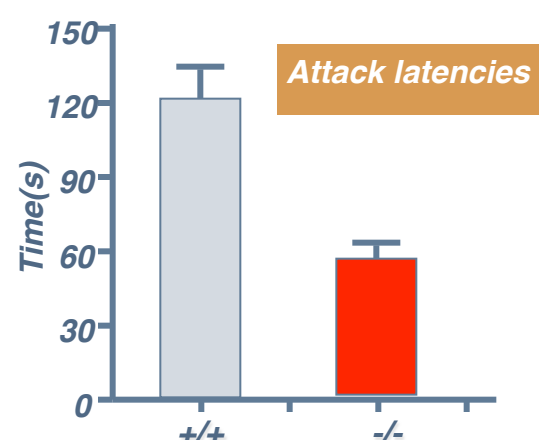
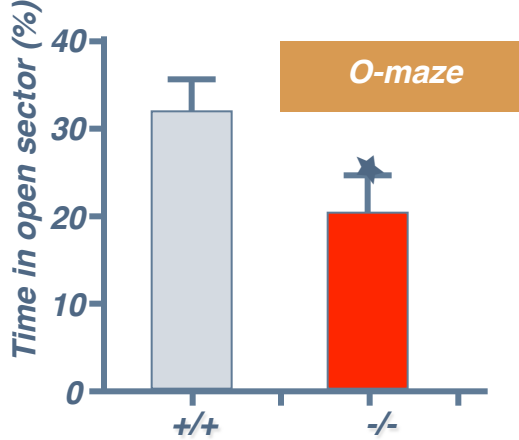
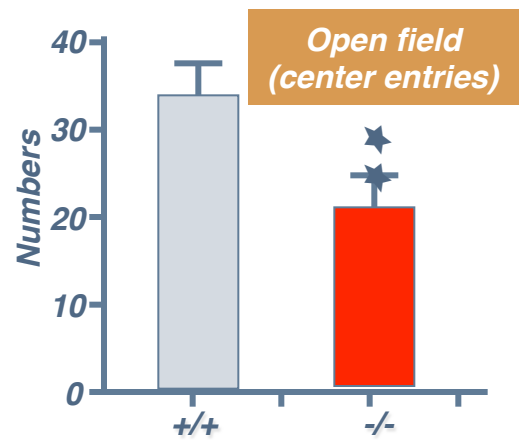
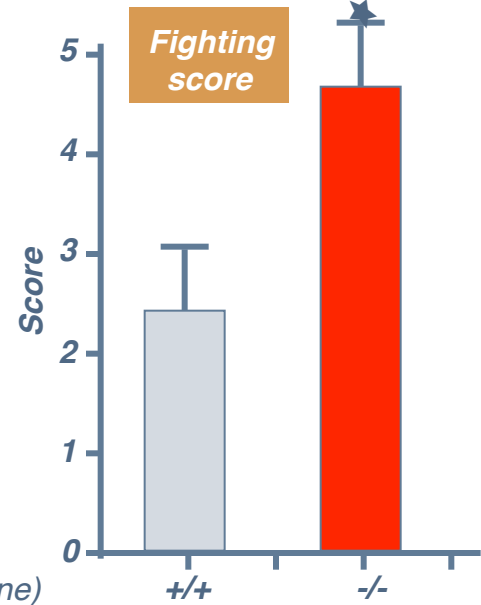
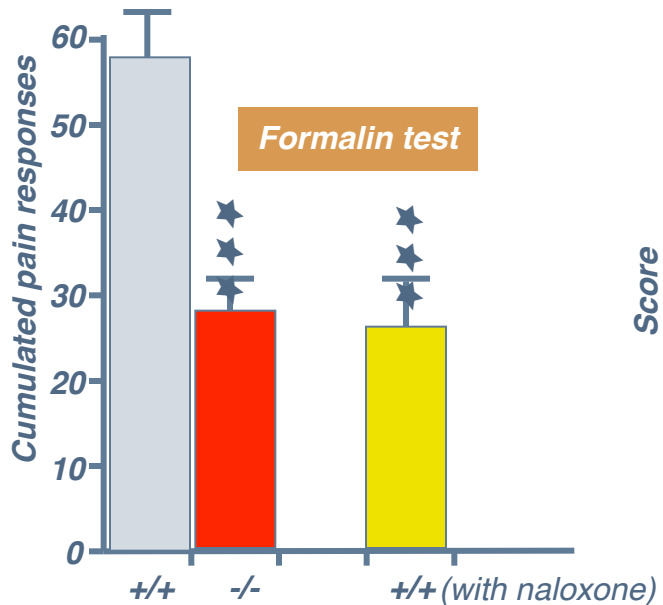
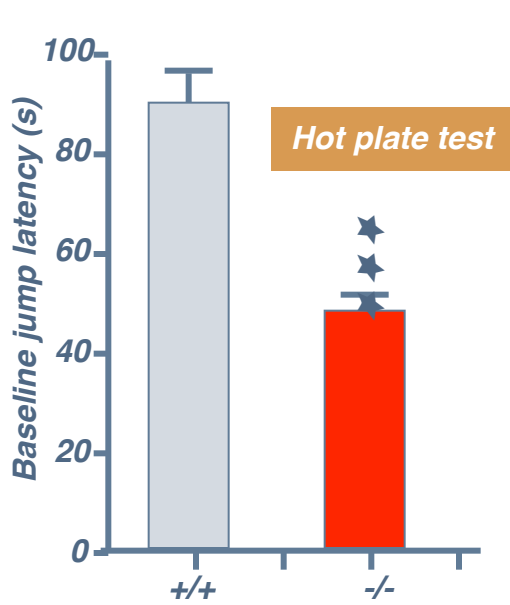
Contrôle de la douleur par exaltation de l'action des morphines endogènes





Pre-pro-Enkephalin KO mice behaviour effects.

... Tyr - Gly - Gly - Phe - Met(Leu) ...





Différences entre l'action analgésique des opioïdes exogènes (ex. MO) et les opioïdes endogènes enképhalines protégées par les DENKIs

Le mauvais exemple : la Met-E, modifiée pour résister aux enképhalinases, développée par SANDOZ - essai chez l'homme – analgésie similaire à MO ... mais tous ses effets indésirables !!

Les avantages de l'utilisation des DENKIs

- ▲ Les opioïdes endogènes (i.e. enképhalines) ont été démontrés responsables des actions analgésiques obtenues en clinique par stimulation transcraniale électrique ou magnétique, acupuncture et autres manipulations
- ▲ Par rapport à MO, les ENKs se comportent in vivo comme des **agonistes purs** avec une **"efficacité pharmacologique" supérieure**
- ▲ Les DENKIs **n'augmentent la concentration locale des ENKs que là où ils sont phasiquement sécrétés** (ex. circuit de la douleur)
- ▲ **Les ENKs même lorsqu'elles sont protégées par un DENKI n'atteignent pas des concentrations suffisantes pour stimuler efficacement les ORs responsables des effets secondaires de la morphine**
- ▲ A l'inverse de MO, les ENKs induisent un **trafic rapide** des ORs stimulés avec **re-initialisation** à la surface cellulaire sous forme active.

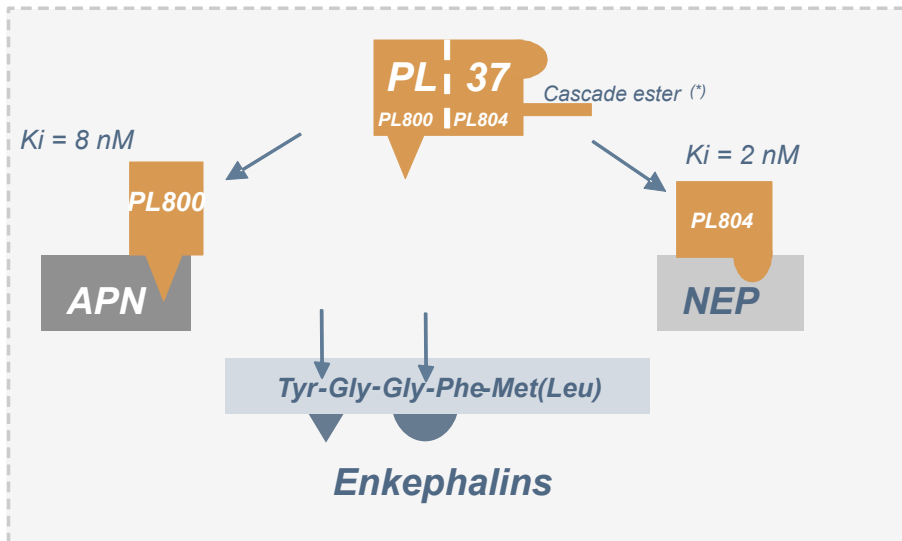
NO ADVERSE EFFECTS

Les inconvénients du contrôle opioïde exogène

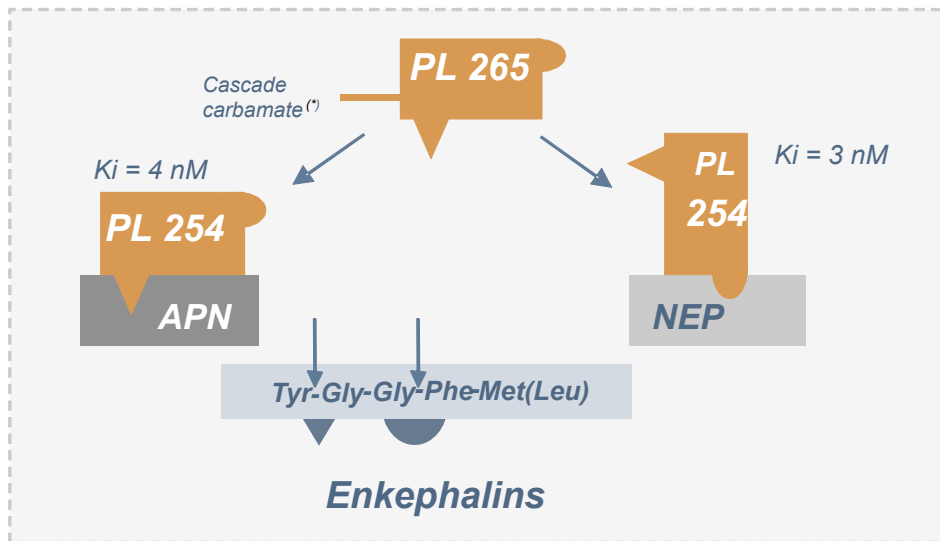
- ▼ Les opioïdes exogènes (i.e. MO) sur-stimulent tous les récepteurs opioïdes y compris ceux non impliqués dans le contrôle de la douleur et **dépourvus** de rôle physiologique
- ▼ **La majorité des effets indésirables (sédation, dépression respiratoire, nausée, constipation, accoutumance ... sont dus à cette stimulation ubiquitaire**

ADVERSE EFFECTS

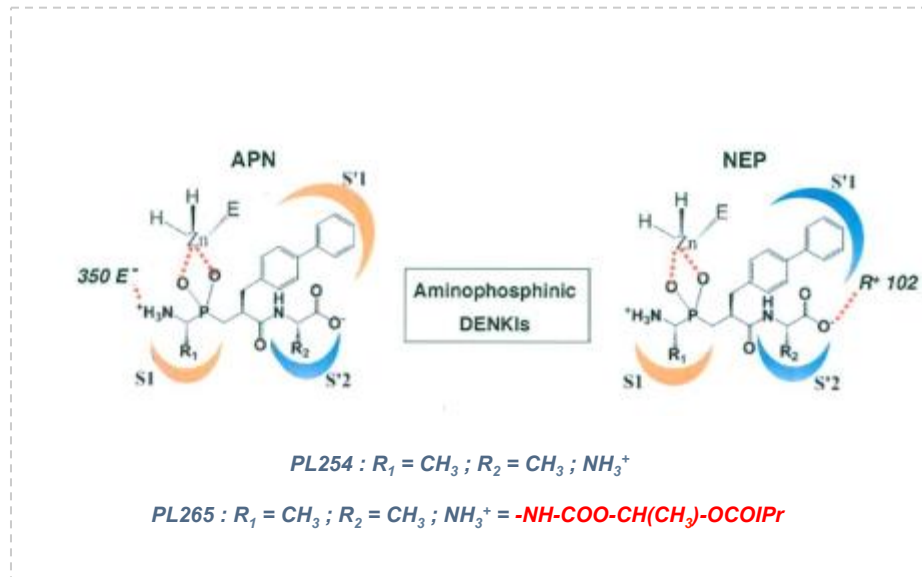
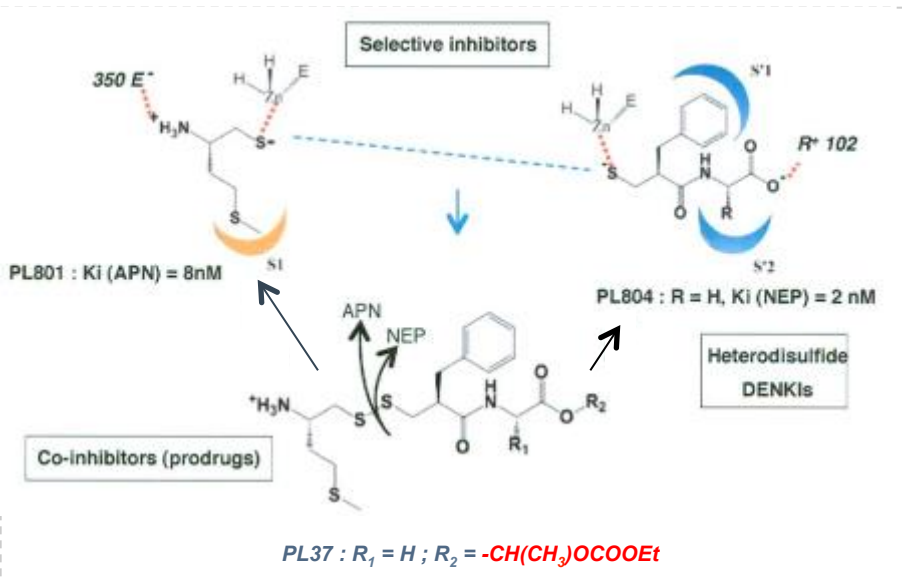
The two leading families of DENKIs



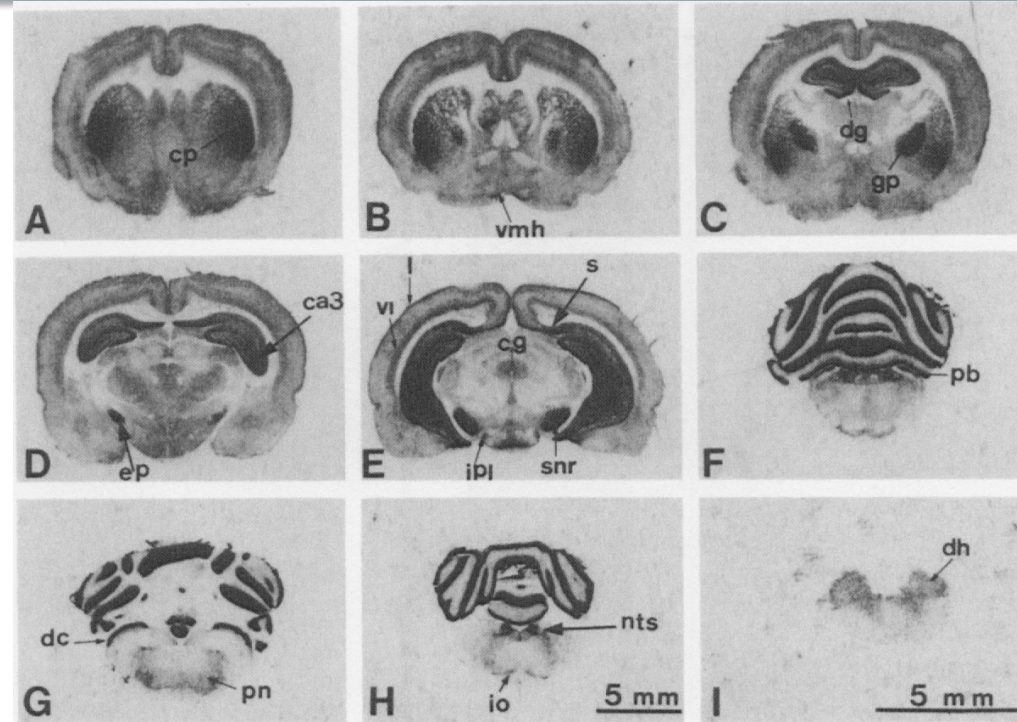
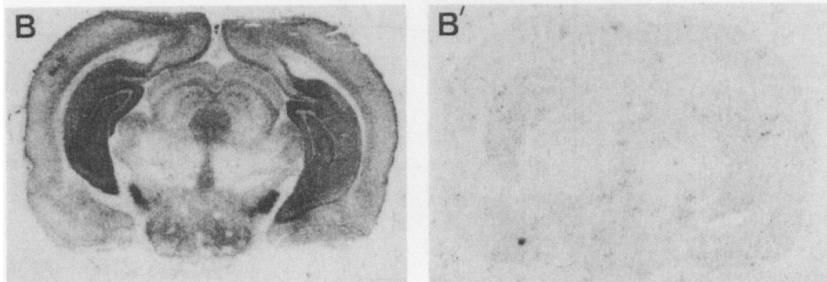
(*) Increases bio-availability



(*) Increases bio-availability

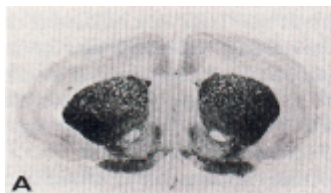


Autoradiographic distribution of neuronal cannabinoid receptor using the CB₁ agonist [³H]CP55,940 (comparison with ORs and NEP/APN distribution)

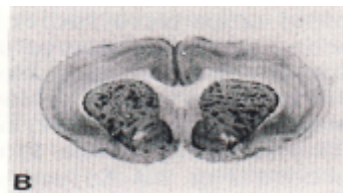


(From Mailleux P & Vanderhaeghen JJ, *Neurosci.* 1992, 48(1) 655-668)

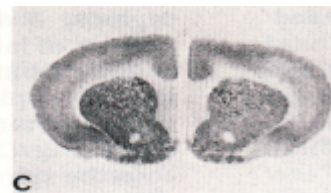
NEP
[³H]HACBOGly



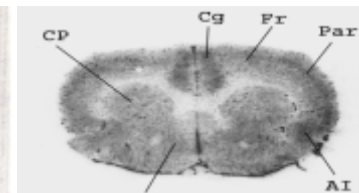
Mu
[³H]DAMGO



Delta
[³H]DTLET



APN
[¹²⁵I]RB 129

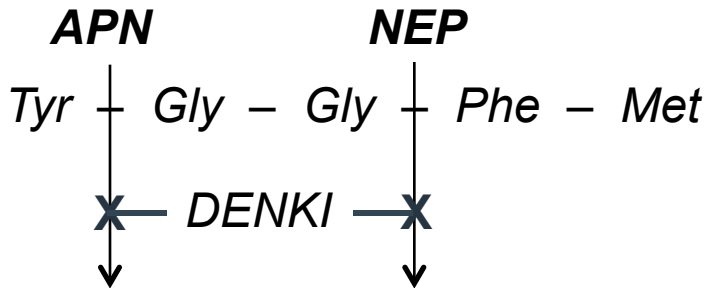
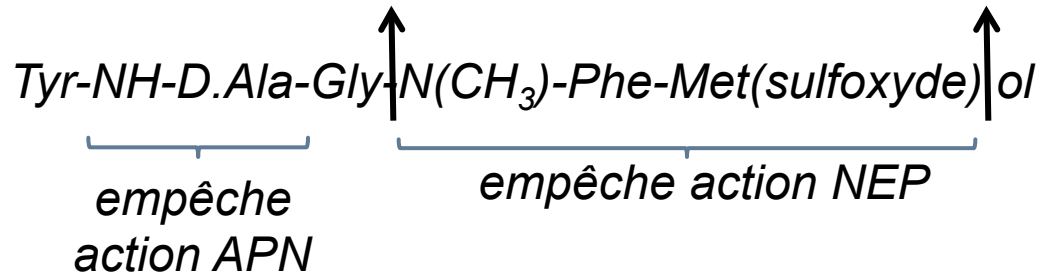


Waksman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1986)

Noble et al., *Neuroscience* (2001)



L'erreur de SANDOZ : exogène n'est pas endogène ! La transposition endogène de Pharmaleads.



FK 3824



Même puissance analgésique
que MO ... mais tous les
effets secondaires.

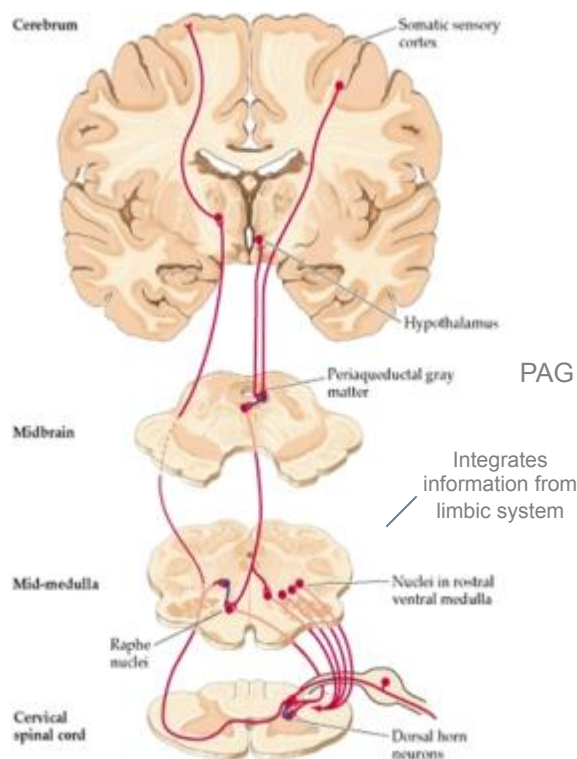
ENKs endogènes + DENKIs



Même puissance analgésique
que MO ... mais absence
quasi totale d'effets
secondaires.

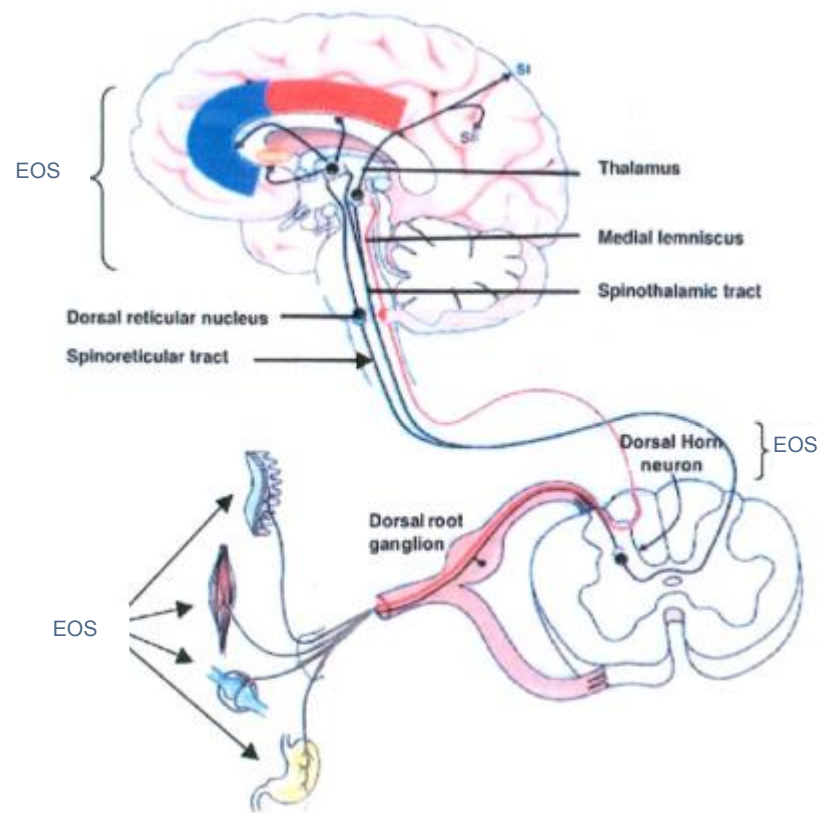
Signalisation opioïde endogène

Le système limbique et les structures cérébrales impliquées dans la mémoire, la peur, l'anxiété, etc, prennent en compte l'état émotionnel et le souvenir des sensations antérieures



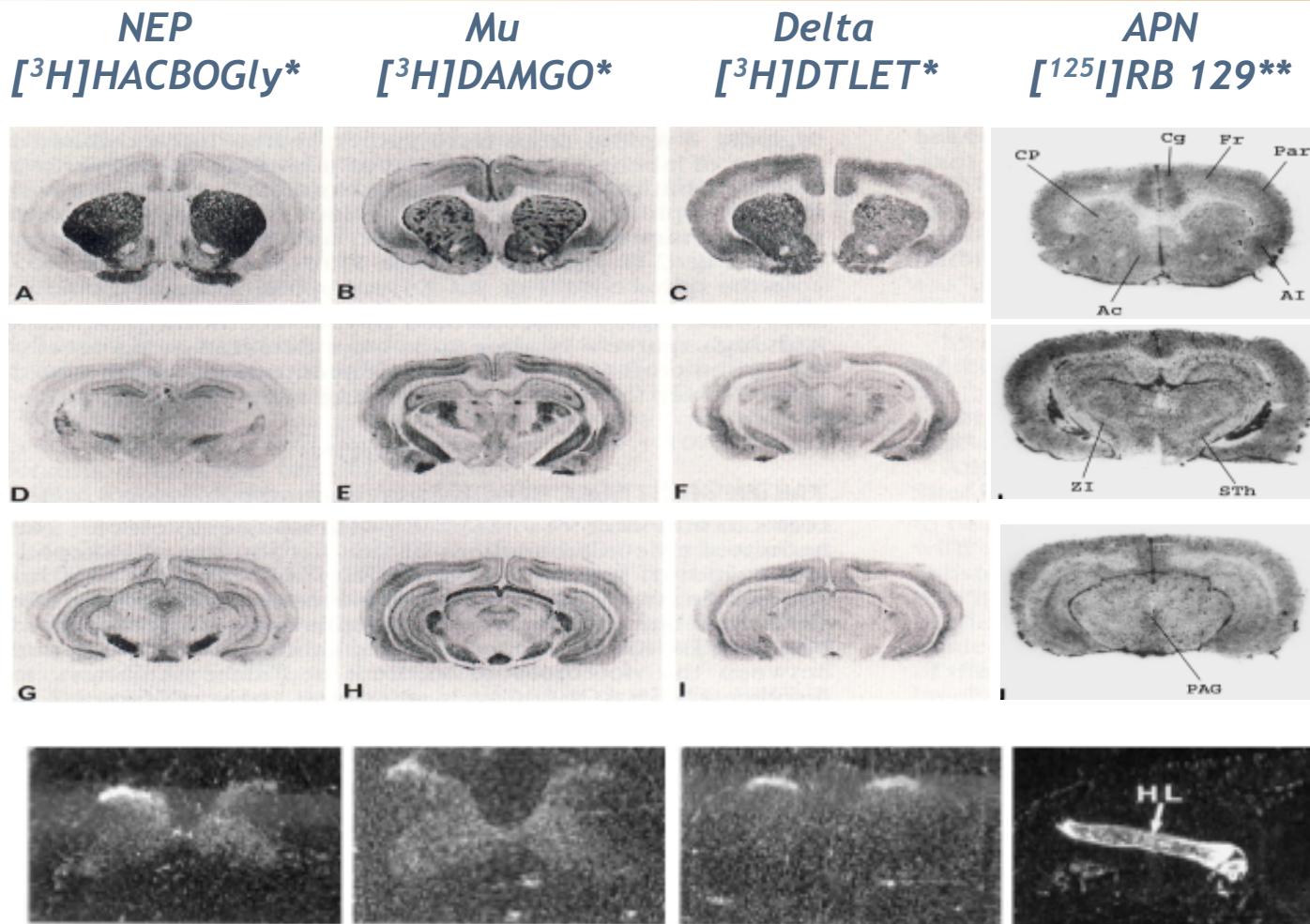
Descending systems
(serotonine, nor-adrenaline)

Central sensory-discriminative network
(quality, intensity, location of the noxious stimulus, emotional context)



C'est le système nerveux périphérique qui génère le signal initial qui sera perçu par le cerveau comme douloureux. Il représente donc une cible particulièrement intéressante pour le développement de nouveaux analgésiques.

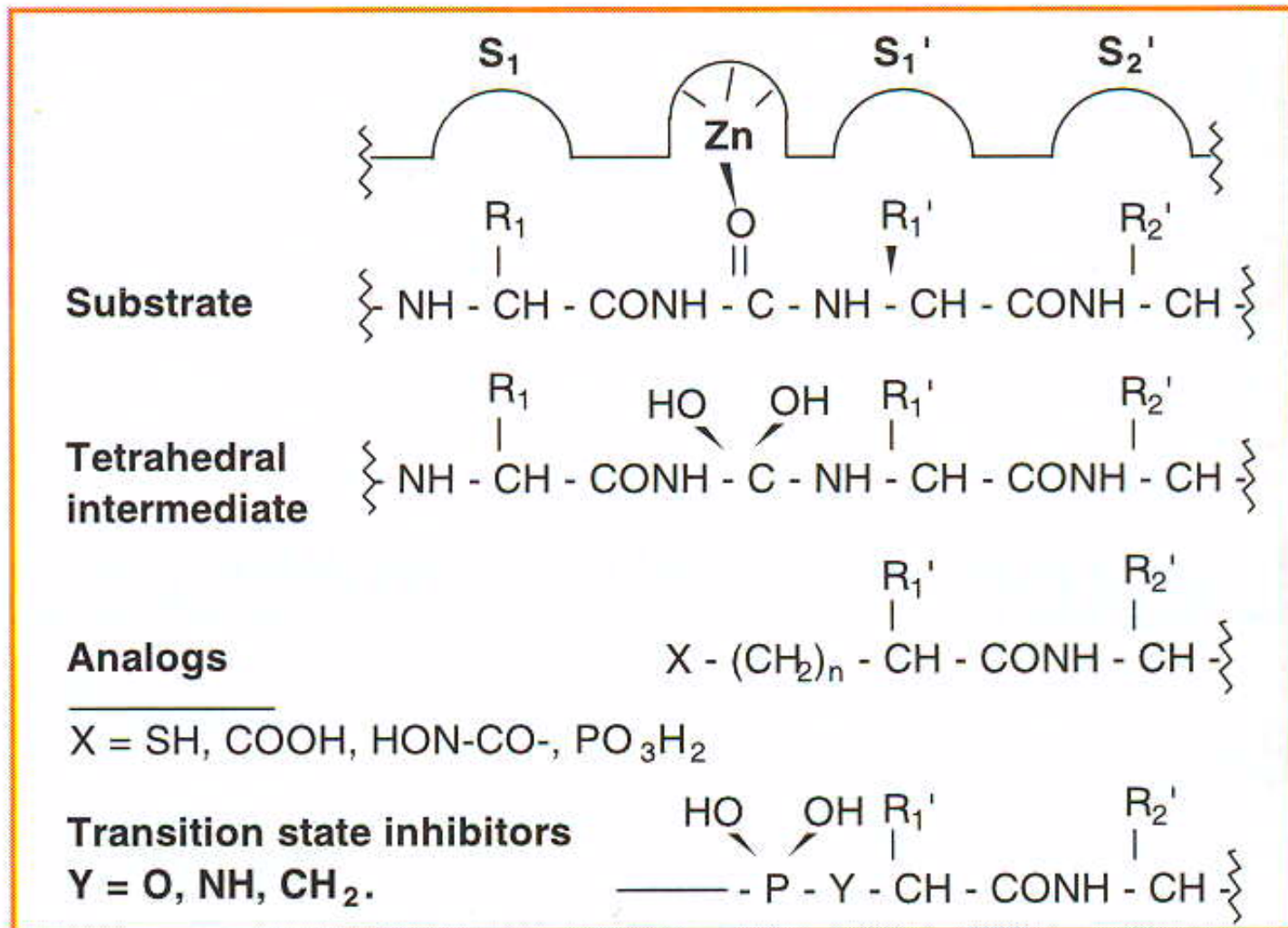
Distribution of MOR, DOR and NEP and APN in rat brain. Effect rhizotomy (right) on MOR, DOR and NEP.



* Waksman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1986)
Waksman et al., *EMBO J.* (1986)
Waksman et al., *C. R. Acad. Sci.* (1984).

** Noble et al., *Neuroscience* (2001)

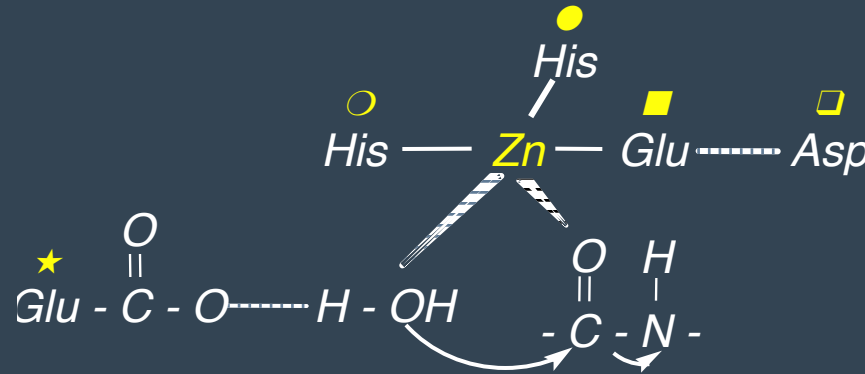
Mode of zinc metallopeptidases recognition by various classes of inhibitors.



Consensus Sequences in the TLN Family of Zinc Metalloendopeptidases



Roques B.P., Trans. Faraday (1993).



A. Endopeptidases

Thermolysin	● ★ ○	■ □
H E L T H	E A I S D	
Neutral endopeptidase	● ★ ○	■ □
H E I T H	E N I A D	
Angiotensin convert. enzyme (N-domain)	● ★ ○	■ □
H E M G H	E A I G D	
Angiotensin convert. enzyme (C-domain)	● ★ ○	■ □
H E M G H	E A I G D	
Endothelin convert. enzyme	● ★ ○	■ □
H E L T H	E N I A D	

B. Exopeptidases

Aminopeptidase N (human)	● ★ ○	■ □
H E L T H	E	
Aminopeptidase A (human)	● ★ ○	■ □
H E I T H	E	

TLN (RX), Matthews et al., *Nature* 1972 ;
 NEP, Devault et al., *EMBO J.* 1987 ; ACE,
 Soubrier et al., *PNAS* 1988 ; ECE, Shimada
 et al., *J. Biol. Chem.* 1994 ; Others, Kell ;
 Pepo.



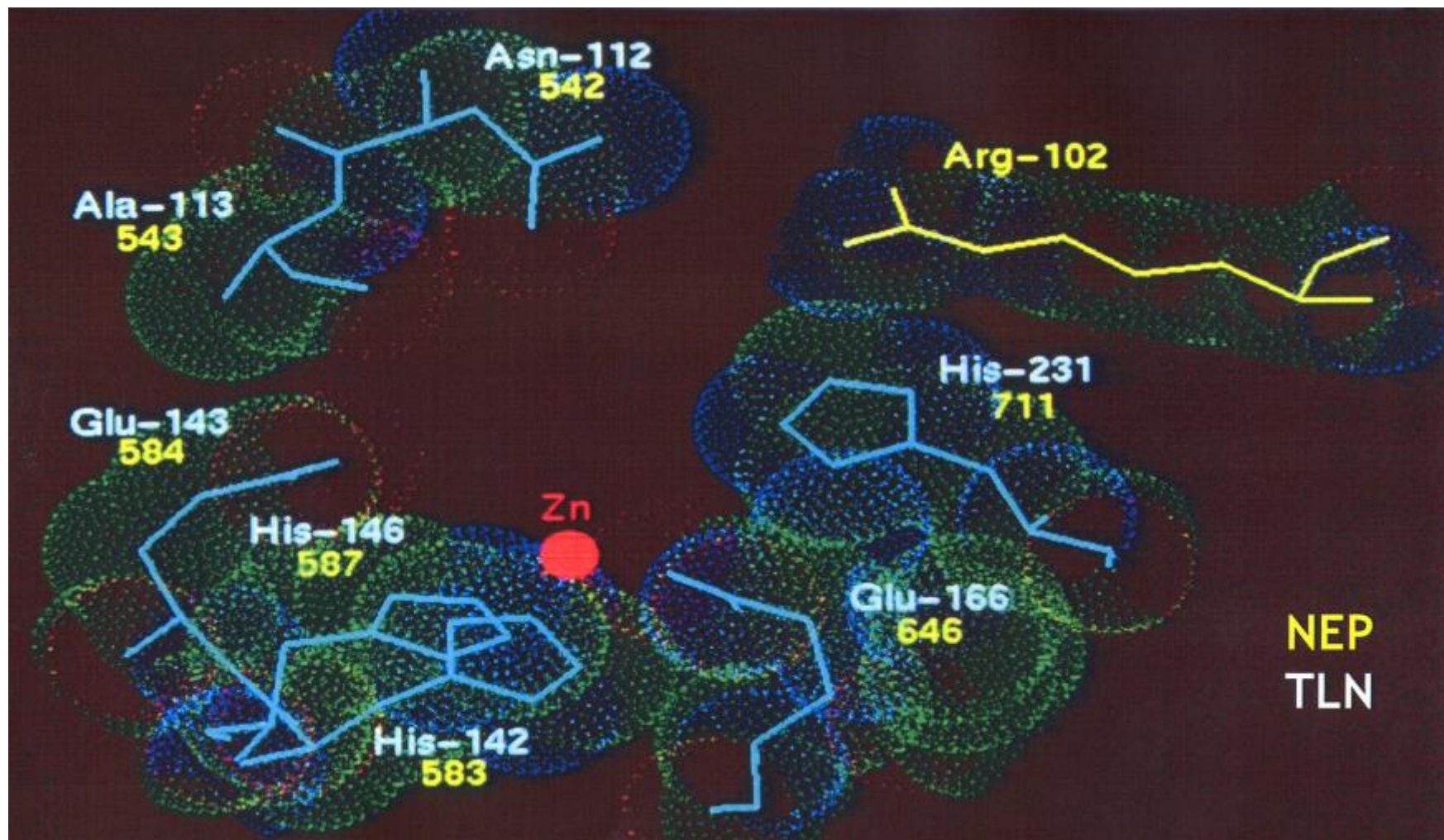
De-risking development with DENKIs

Why are translational models more predictive with DENKIs than with other pain killers?

- The Endogenous Opioid System (EOS) – which is the sole target of DENKIs – plays a central role in pain control and is extraordinarily well preserved across species in particular between rodents and humans
- The EOS is present at all levels in pain control in all species: the sites of action of DENKIs are the same for rodents and humans
- The i.d. capsaicin test is considered a reliable predictive test in translational medicine from healthy volunteers to actual patients affected with neuropathic pain (NP), in particular on NP symptoms (allodynia, hyperalgesia)



Homology modelling of NEP catalytic site



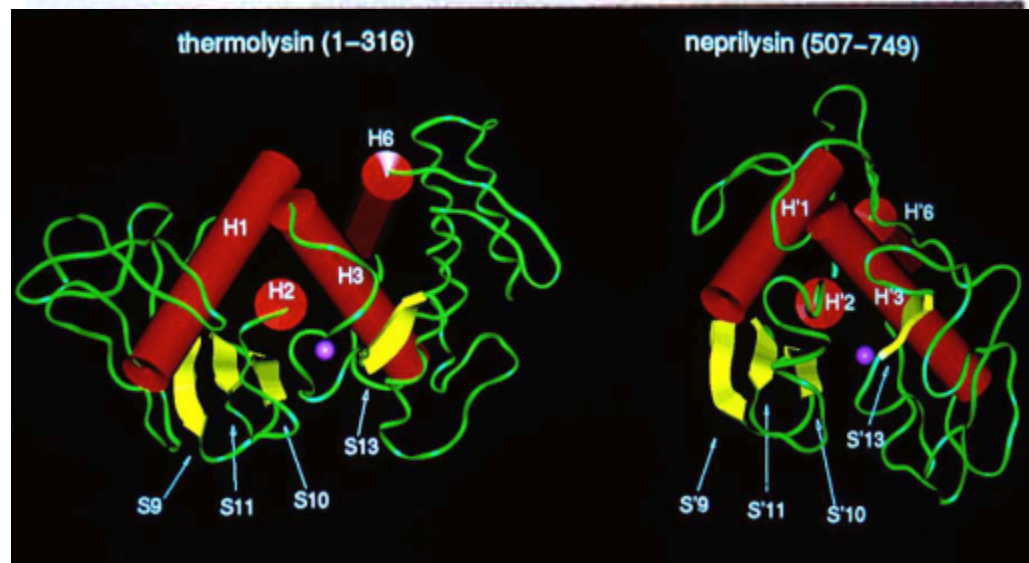
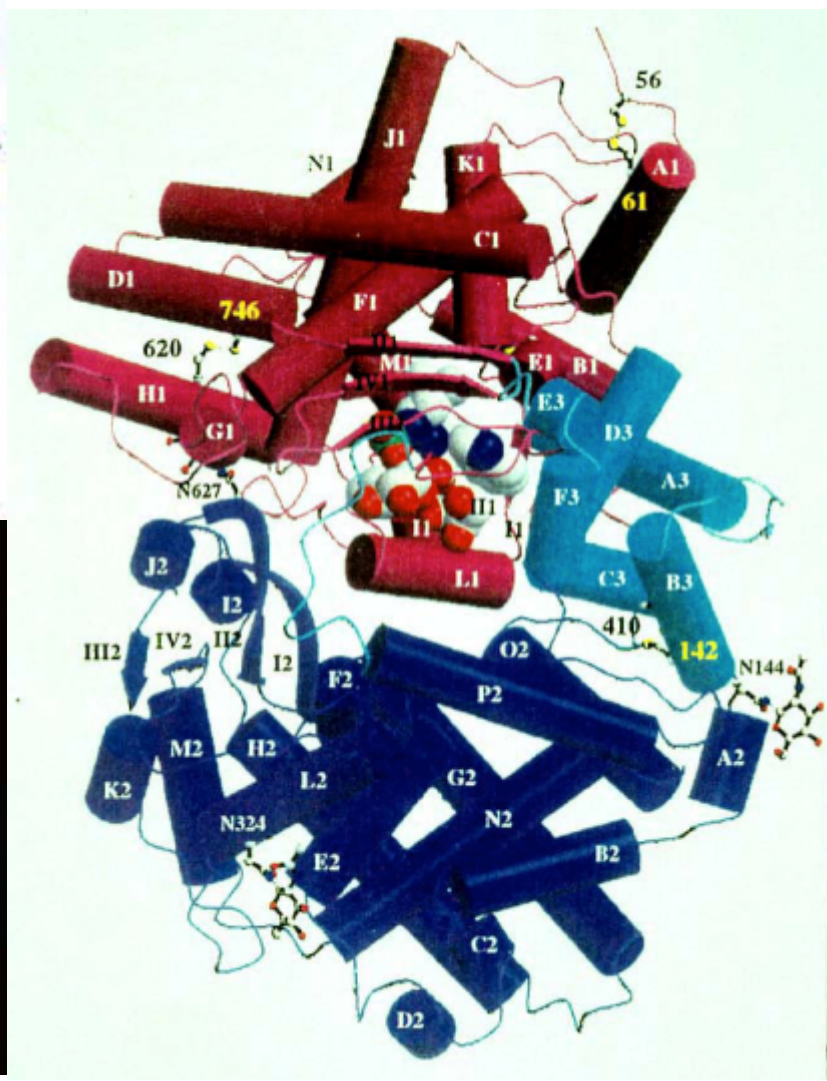
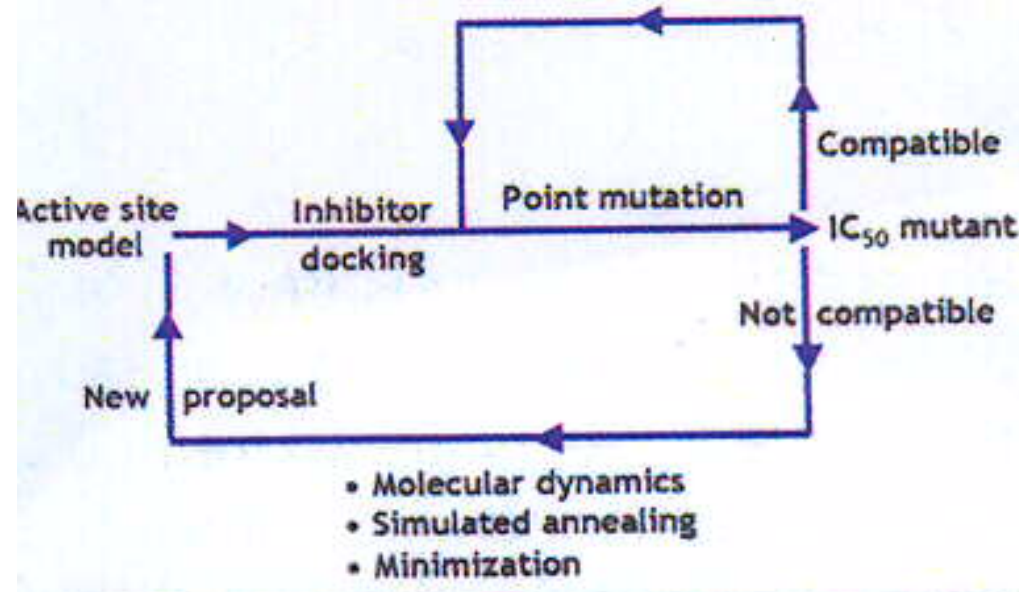


Homology modeling : from TLN to NEP



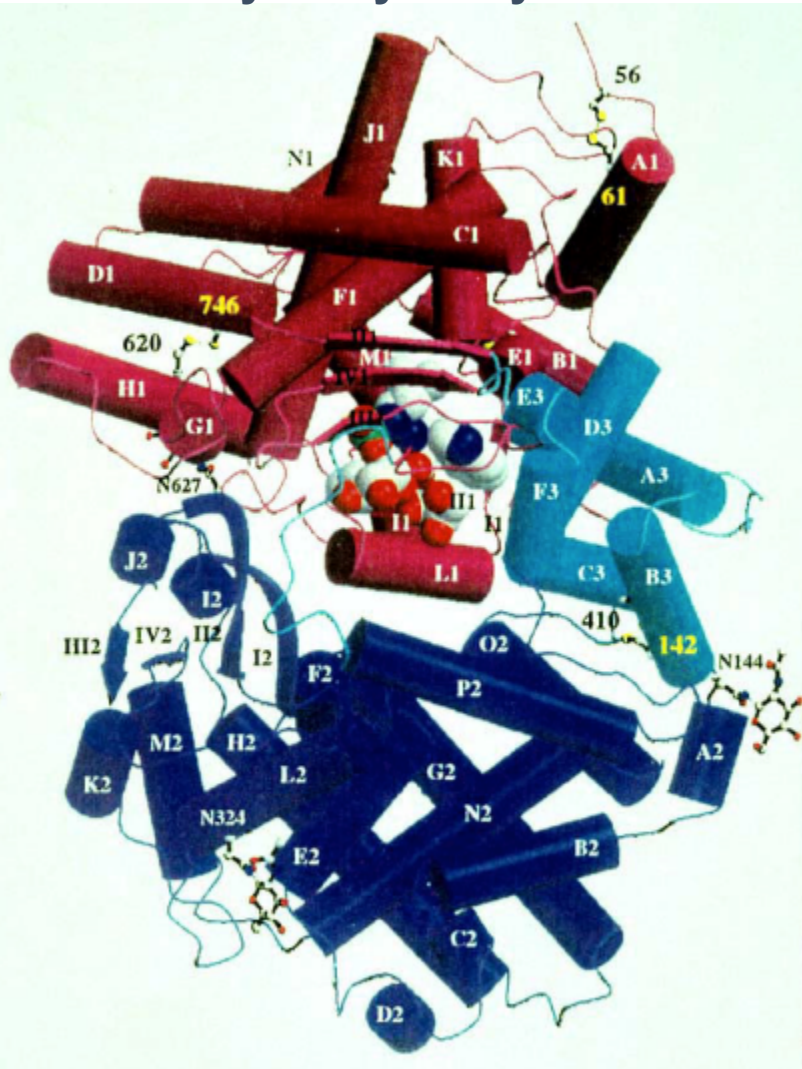


Site-directed mutagenesis coupled to molecular modeling for active-site NEP structure proposal. Comparison with TLN and NEP (RX)





Structure of Neprilysin by X-ray analysis

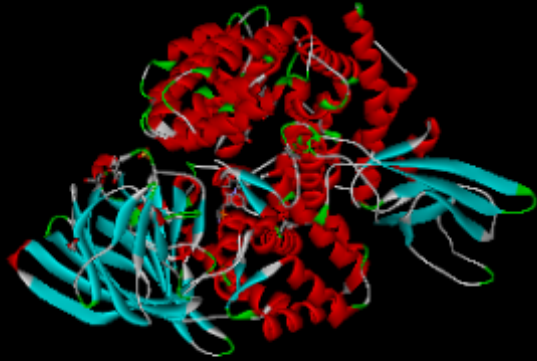


Structure of hNEP with thiorphan



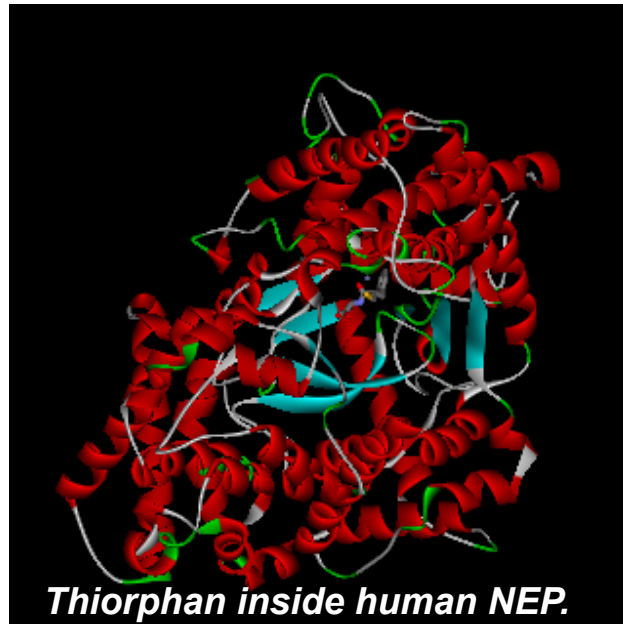


Crystal structure of various inhibitors complexed with NEP or APN.



Phosphinic inhibitor in APN.

*(Coll. T. Yoshimoto,
Nagasaki University, Japon)*



Thiorphan inside human NEP.

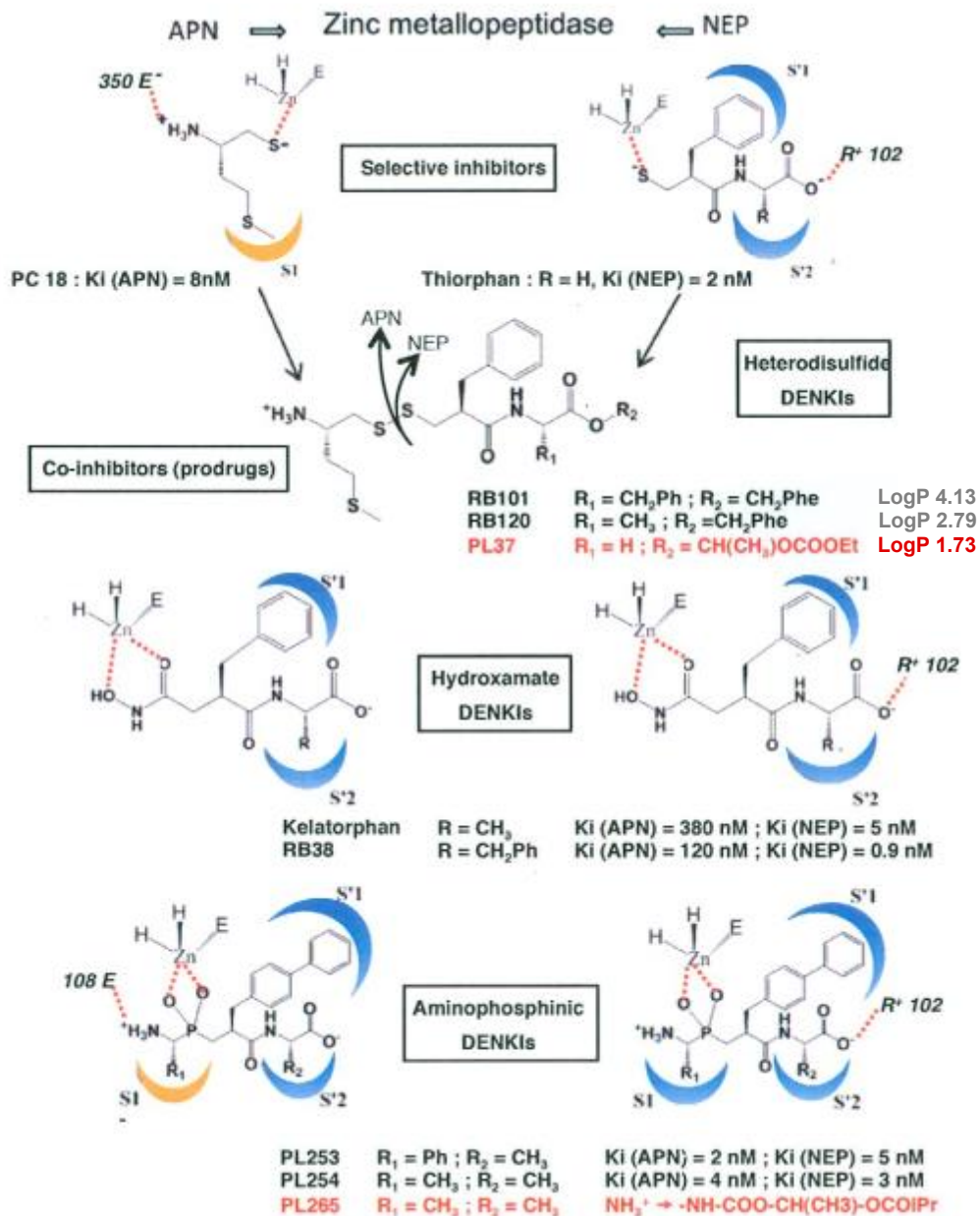
*(Coll. G. Dale,
ROCHE Ltd, Switzerland)*



Phosphinic inhibitor in NEP

*(Coll. G. Dale,
ROCHE Ltd, Switzerland)*

Structure inhibitory potencies of three families of dual enkephalinases (NEP/APN) inhibitors DENKIs.



- Rapid cleavage of the cascade ester followed by *in vivo* reduction of the disulfide bond.

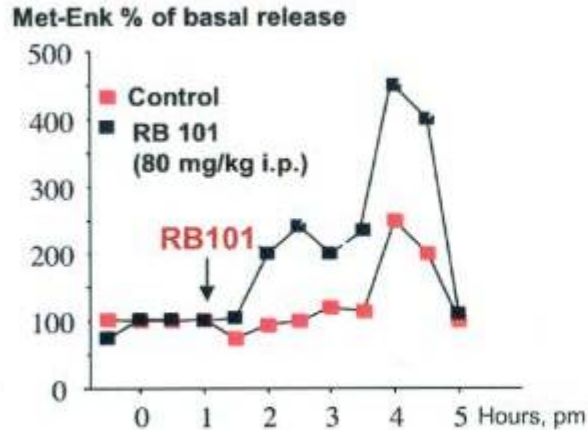
- Both active moieties inhibiting APN and NEP act independently

- Rapid cleavage of the ester. No reduction required

- The same molecule inhibits both enzymes

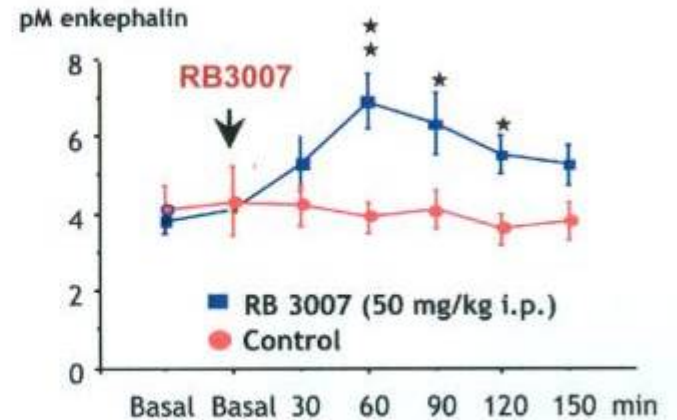
Effect of DENKIs on the extracellular efflux of Met-enkephalin in the *nucleus accumbens*, periaqueductal grey (PAG) and cerebrospinal fluid (CSF) *Microdialysis or superfusion in awake and freely moving rats*

Nucleus accumbens



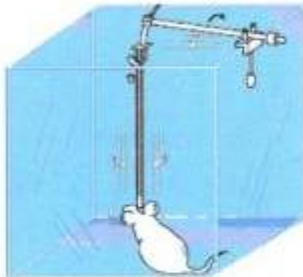
Daugé et al. (1996) *J. Neurochem.* 67:1301-1308

PAG



Le Guen et al. (2003) *Pain*

RB101, RB3007 and kelatorphan are dual NEP-APN inhibitors and predecessors of PL37

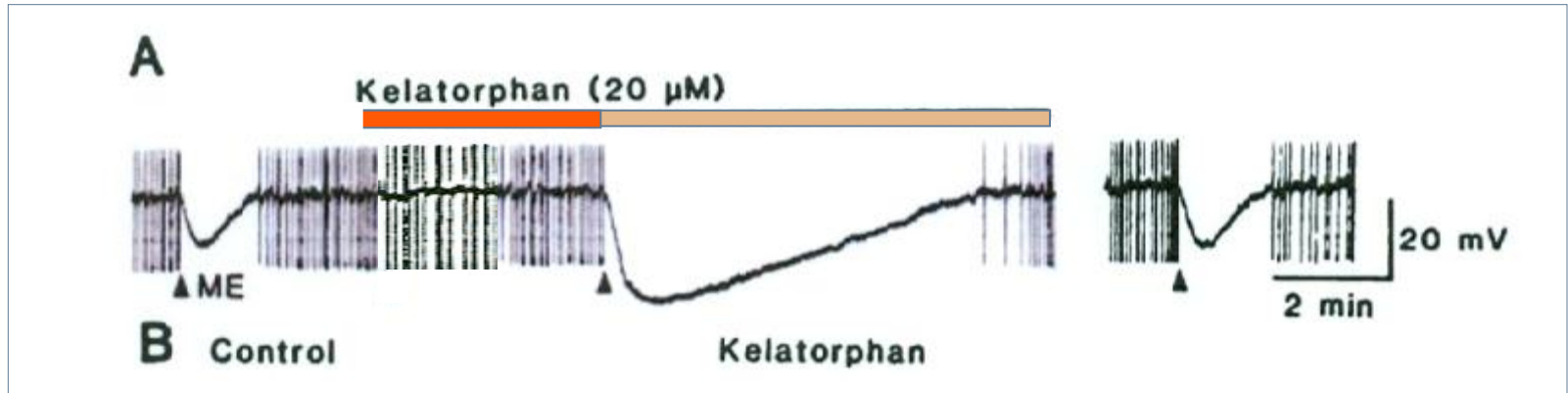


Treatment	Met-Enkephalin (pg/fraction)	
	Control	Kelatorphan
None (tonic)	4.33 ± 0.4	10.82 ± 1.38
Muzzle pinching (phasic)	10.10 ± 1.26	22.28 ± 4.60

Sub-arachnoid space of anesthetized rats (n=6). was perfused by artificial CSF with or without kelatorphan 20 μ M and fractions (0.5 ml/5 min) were collected. Muzzle pinching with a forceps for 10 sec.

**Potentiation de l'action de la Met-enkephaline (ME) sur les neurones du locus coeruleus par le kélatorphan.
Absence d'effet propre du kélatorphan.**

Le locus coeruleus est une structure cérébrale impliquée dans le contrôle de la respiration et du rythme cardiaque ainsi que dans les phénomènes addictifs.



Exogenous ME (or MO) applied by pressure pulse (▲) on slice containing the LC, leads to hyperpolarization. The response is amplified by kelatorphan (J.T. Williams et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 243(1), 397-401, 1987)

Le Kelatorphan seul est inactif indiquant l'existence d'une libération basale très faible des ENKs dans cette structure

De ce fait les DENKIs n'ont pas d'effet indésirable sur la respiration tant chez l'animal (E. Boudinot et al., Pain 90, 7-13 (2001) que chez l'homme (étude clinique du PL37)

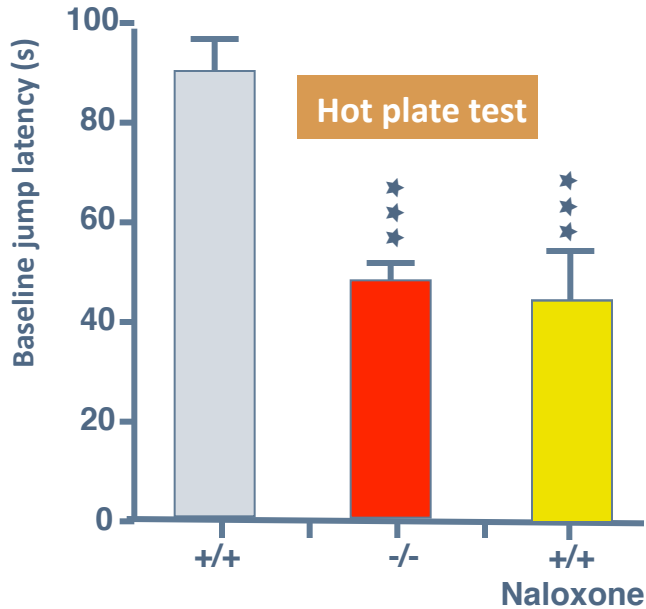


Pharmacological effects of pre-proenkephalin (PENK) gene KO in mice

i.c.v. ENKs : transient MO-like antinociceptive effect at high doses due to rapid metabolism

i.c.v. in mice

ED₅₀ MO : 0.63 nmol/mouse; ED₅₀ Met-E : 330 nmol/mouse (*Interussi, PNAS 1980*)
ED₅₀ Met-E+kelatorphan (50 µg) : 1,2 nmol/mouse (*Fournié-Zaluski, EJP 1984*)

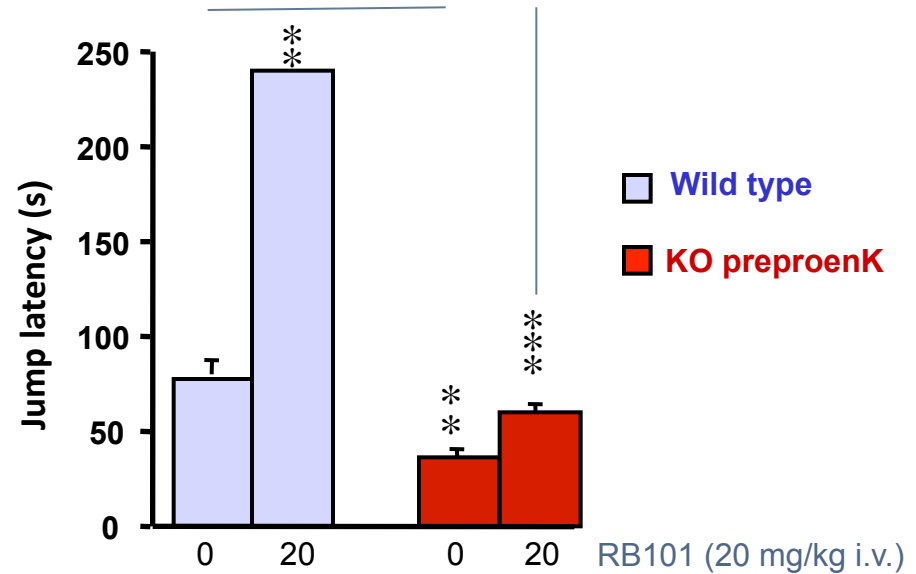


*** P < 0.001

Cutt-off 240 s

A physiological enkephalin tone is active in pain control

König et al. Nature (1996)



* P < 0.05 ; ** P < 0.01 as compared to wild-type control mice

No change in morphine-induced antinociceptive effect in PENK-KO mice.

DENKIs' antinociceptive effects are specifically related to enkephalin protection

Noble F., Psychopharmacol. (2008)



Les démonstrations initiales de l'efficacité de l'approche DENKI chez l'homme

- En 1988, l'injection intrathécale du mélange de **thiorphan** selective NEP inhibiteur (2 nM) et de **bestatine**, faible et non spécifique, inhibiteur d'APN (IC_{50} - 4000 nM).
- Effets prolongés d'inhibition totale de la douleur (>18 heures) chez les 5 patients traités (J. Meynadier et al., J. Pain Clinic, 1988) devenus complètement **résistants à la morphine** et/ou ne la supportant plus.
- Un effet analgésique encore **plus important** a été observé avec le même protocole chez le même type de patient (J. Meynadier, non publié) avec **Kélatorphan, premier DENKI**, NEP (4 nM), APN (360 nM).
- Pour des raisons pharmacocinétiques, le **Kélatorphan** ne peut être transformé en médicament mais le résultat a **ouvert la voie aux DENKIs**.
- Comme attendu le **thiorphan i.v. ne possède pas d'action analgésique chez l'homme** (J.C. Willer et al. Neuropharmacol. 1986).

Puissance analgésique similaire de la morphine et des enképhalines par voie i.v. dans les modèles des douleurs aiguës.

i.c.v. in mice

ED₅₀ MO : 0.63 nmol/mouse; ED₅₀ Met-E : 330 nmol/mouse (*Interussi, PNAS 1980*)
 ED₅₀ Met-E+kelatorphan (50 µg) : 1.2 nmol/mouse (*Fournié-Zaluski, EJP 1984*)

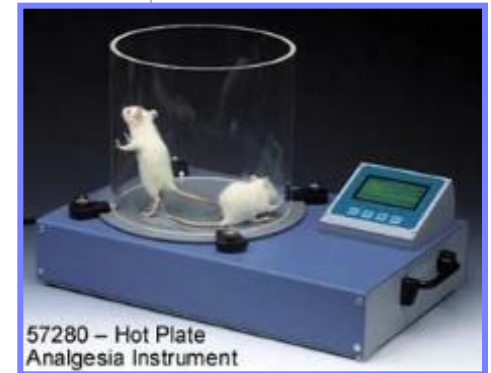
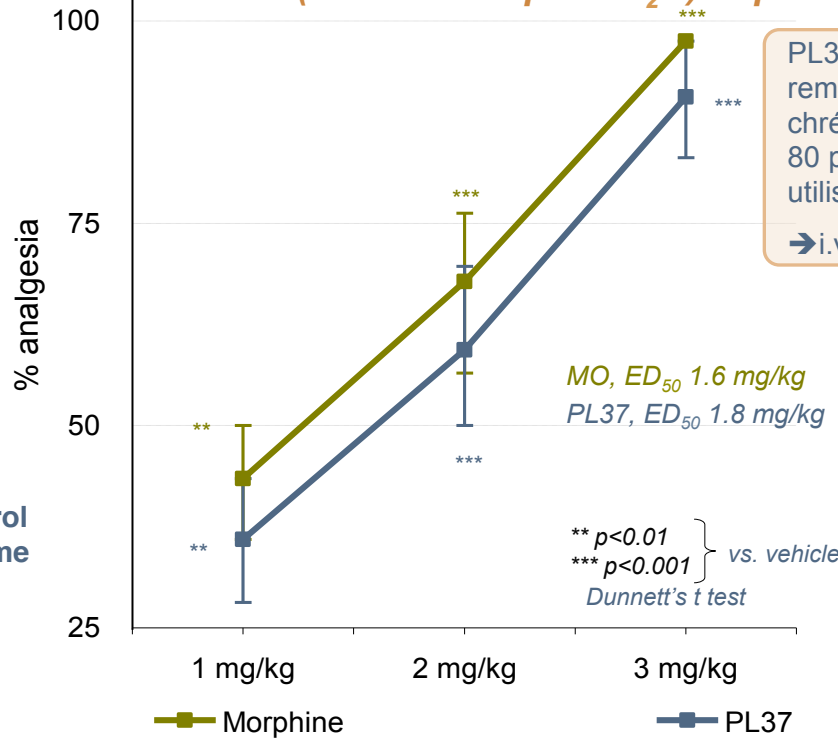
Comparison between i.v. morphine and i.v. PL37 in the Hot Plate Test (HPT)

vehicle (EtOH/cremophor/H₂O) improving BBB crossing

Toutes les réponses sont inhibées par pré-administration de naloxone

PL37 ED₅₀ par remplacement du chrémophor ou du tween 80 par une cyclodextrine utilisable chez l'homme
 → i.v. perf douleur aigüe ?

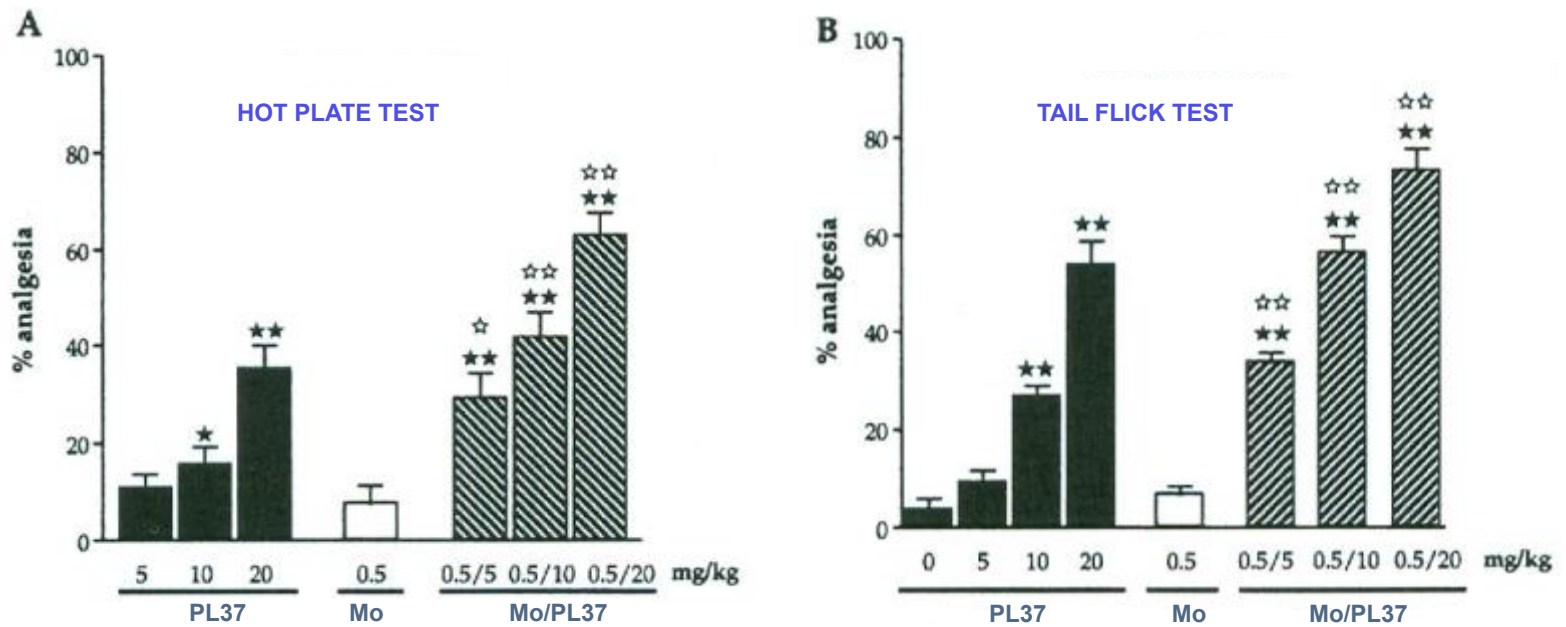
% analgesia = 100 x (test latency – control latency) / (cut-off time – control latency)



Analgesic effects of morphine or PL37 injected i.v. 10 min before the test in the hot plate test in mice (jump response). Points represent the percentage of analgesia for n = 8 mice. Control group corresponds to i.v. administration of vehicle.



Synergistic antinociceptive effects to acute « pain » of morphine MO (iv) and PL37 (iv) in combination at subanalgesic doses in the hot-plate test in mice (A) and tail-flick test in rat (B).



- Synergy demonstrated by isobolographic analyses.
- **Three to four times reduction in MO or PL37 for identical pain alleviation.**

Possible explanations (see Mas-Nieto et al., Neuropharmacol (2001) and ref herein)

- MO-induced release of ENKs (Xu, H. et al. Brain Res.1989).
- ENK-dependent increase in active opioid receptors at the membrane level (Song J. Neurosci. 2003 : Whistler, Neuron 1999)

The language of translation – circuits not behaviour

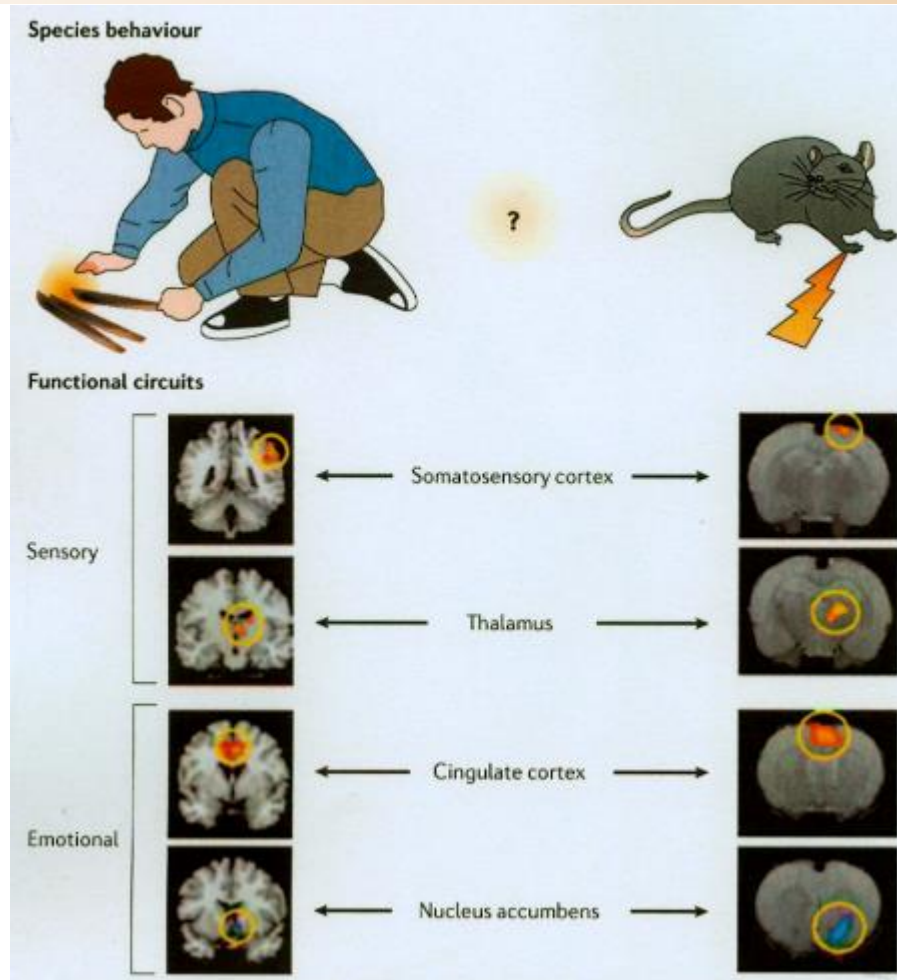


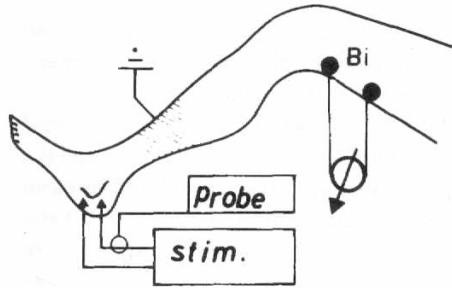
Figure shows fMRI data from rats and humans exposed to the same thermal stimulus (46°C) that activates nociceptors in a similar manner across mammalian species. Note that activations in sensory and emotional systems are not only similar for structures and within structures (medial and lateral thalamic activations) but also for strength of signal (decreased signal in the nucleus accumbens). **The specific fMRI signature or function fingerprint is directly related to physiological activity of the drug or class of drugs.**



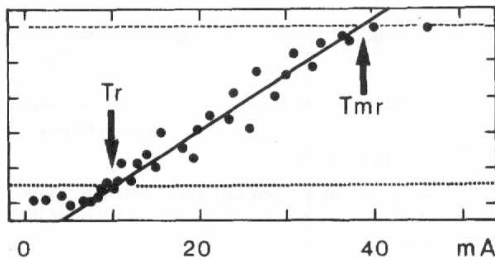
Measurement of flexion reflex and corresponding subjective pain score elicited by sural nerve stimulation in humans.

Extension to predictive potencies of analgesics from i.v. rat studies.

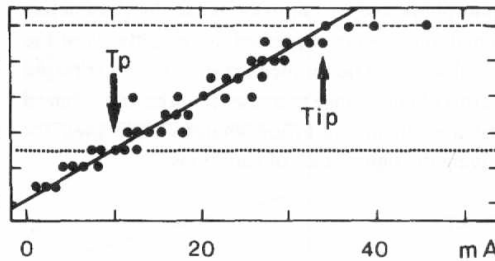
Currently used analgesics.



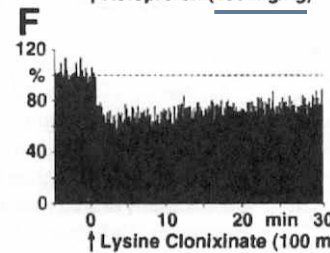
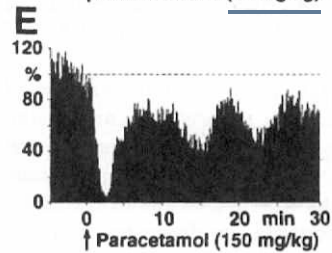
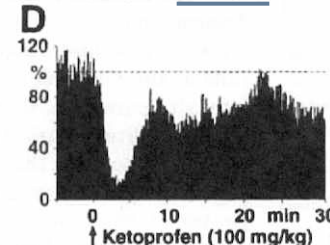
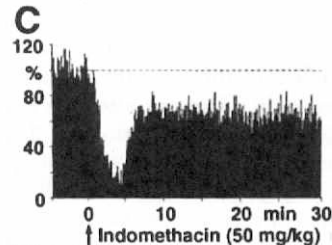
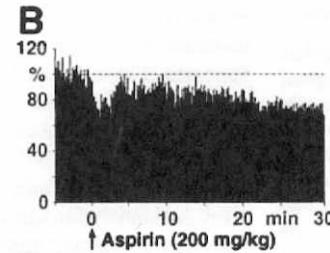
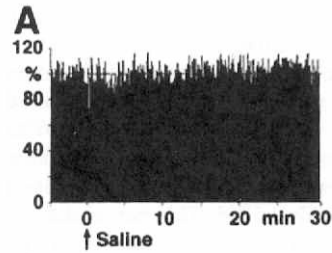
NOCICEPTIVE REFLEX (as % of max)



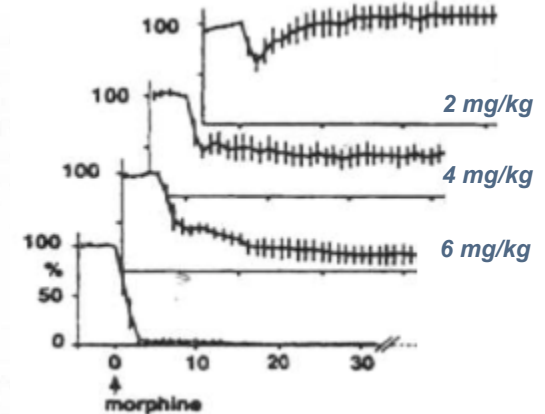
SENSATION (a.u)



JC Willer, Brain Res. 1985.

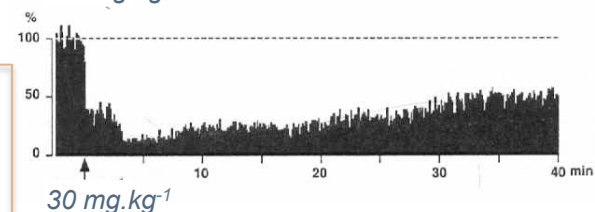
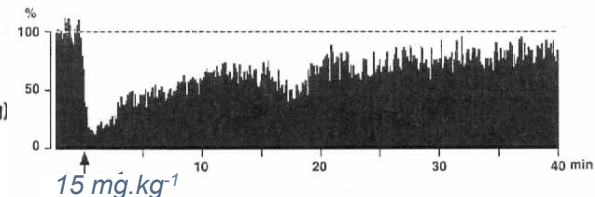


D. Busde et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 1996.



F. Quirimand et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 1993.

RB101, immediate precursor of PL37.

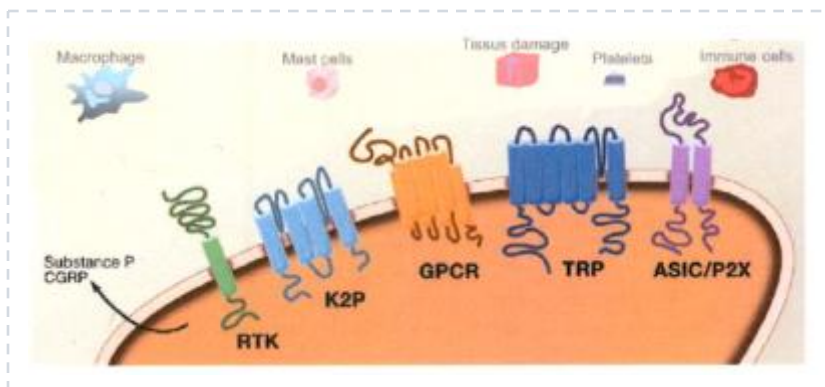


JM Benoist et al., Eur. J. Pharmacol. 2002

Hot plate test mice in EtOH/chremophor/H2O (1/1/8)
 MO same conditions 1.6 mg/kg
 RB101 : ED₅₀ = 9 mg/kg/iv
 PL37 : ED₅₀ = 1.8 mg/kg/iv

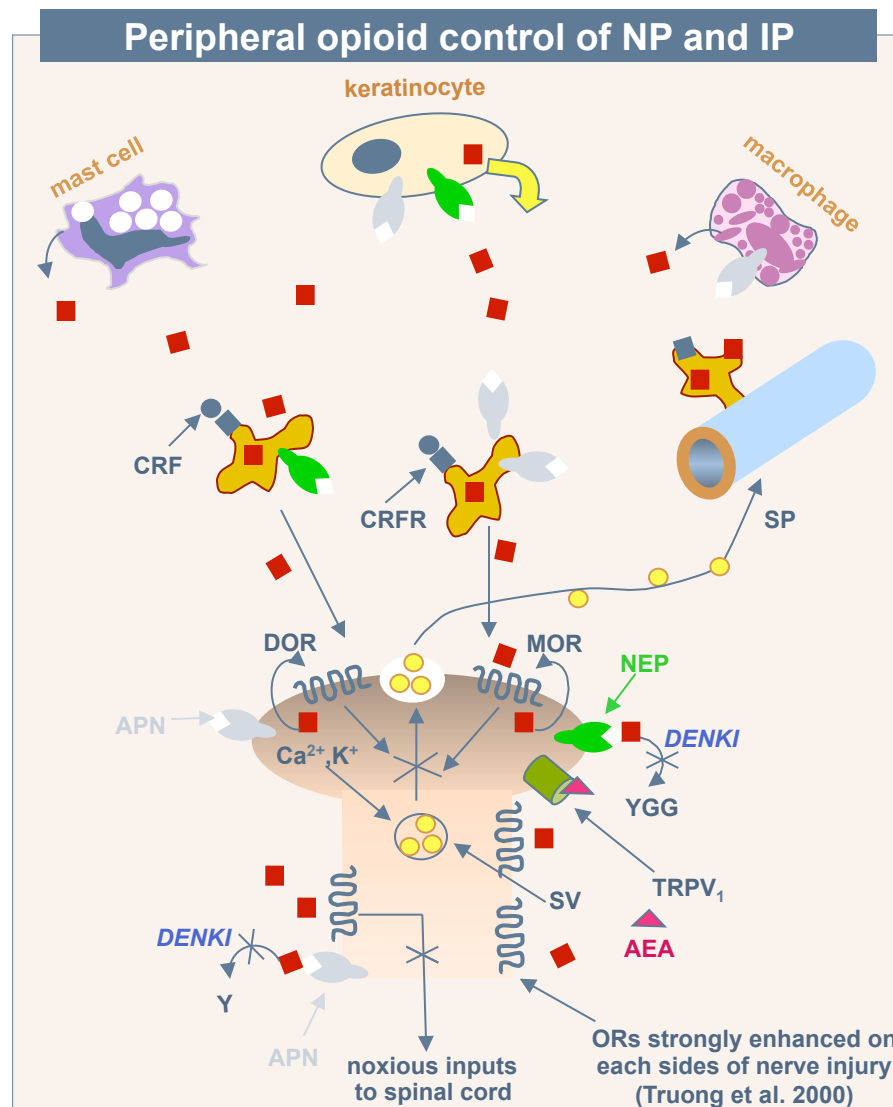
Peripheral control of inflammatory and neuropathic pain by DENKI-protected enkephalins diffusing in an extended synaptic area

- Pharmaleads has developed orally active DENKIs which do not enter the CNS,
- and are hence devoid of behavioural effects



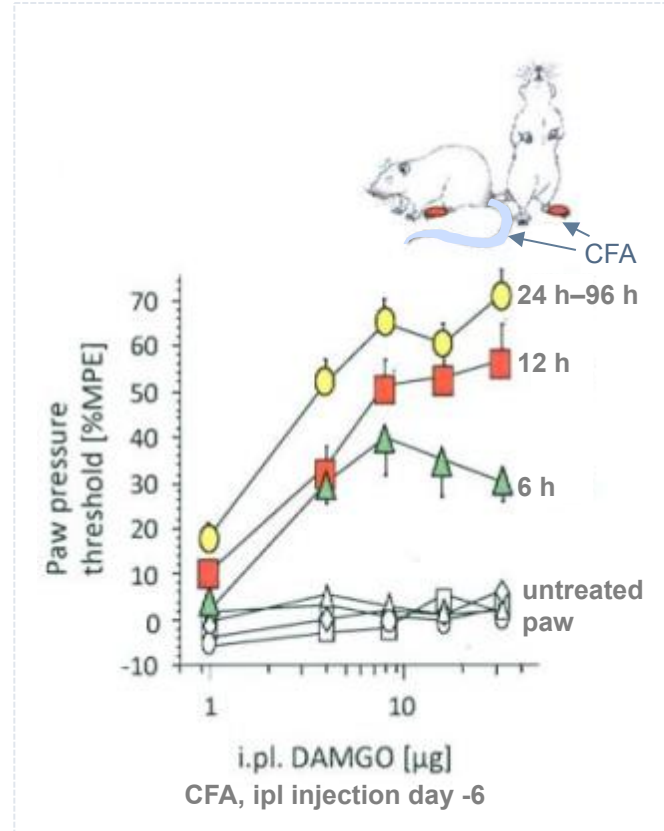
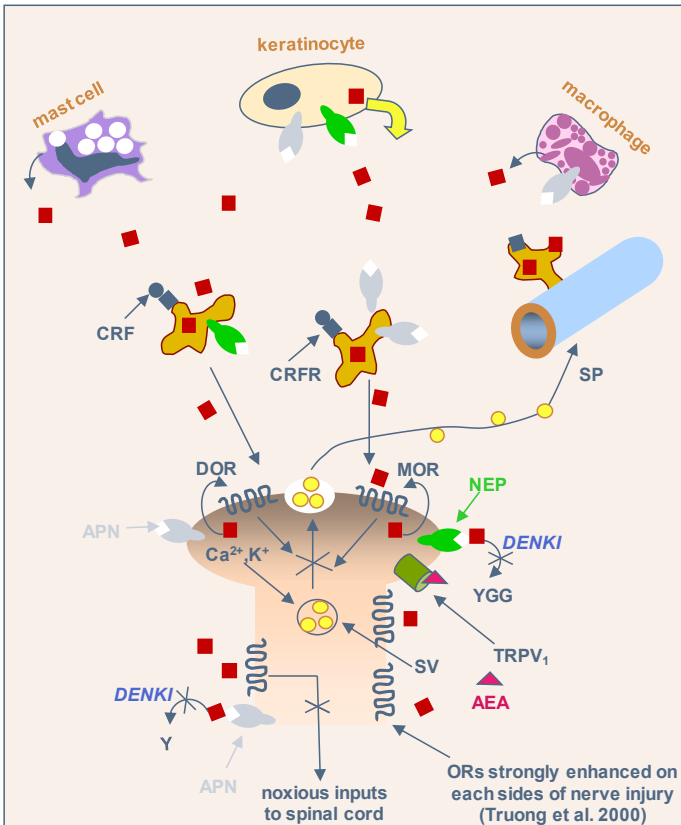
Noxious stimulation of specific targets on peripheral nociceptor terminal

Peripheral mediators released in tissue damage (inflammatory pain) or in nerve injury (neuropathic pain). NGF, BK, 5HT, ATP, H⁺, TNF α , IL6, histamine, ET₁

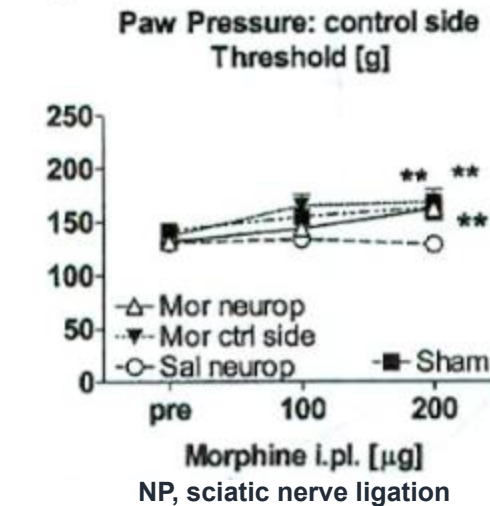
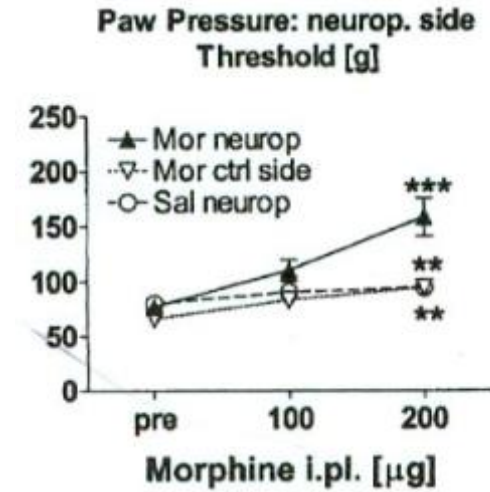


Mechanism of action for peripheral analgesic effects of DENKIs-protected enkephalins in chronic pain and Ors hypersensitivity

- In models of neuropathic (CCI in rodents) and inflammatory pain, release and concentration of enkephalins increase constantly during a week or two before plateauing for as long as the injury lasts (Zollner et al. 2008)



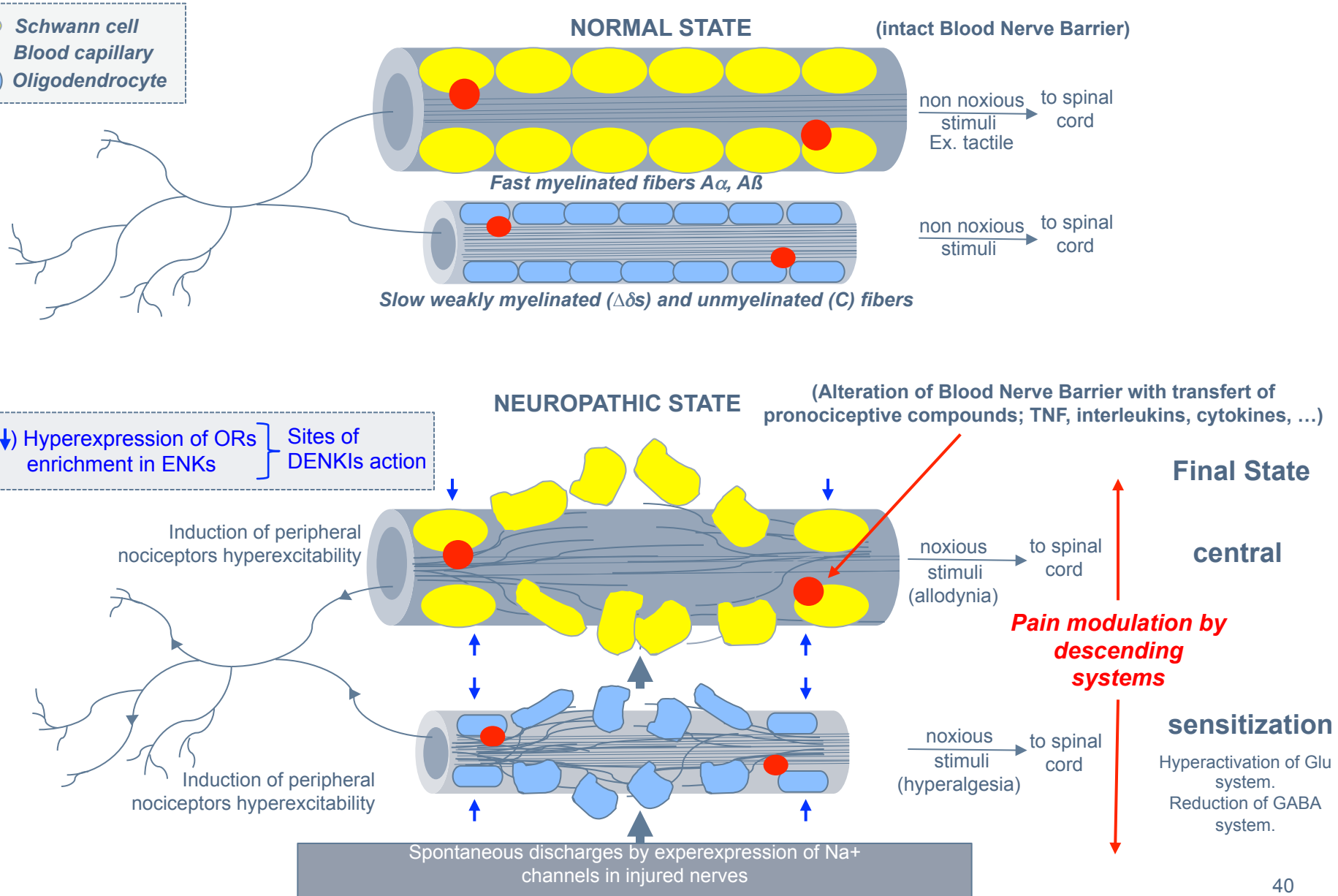
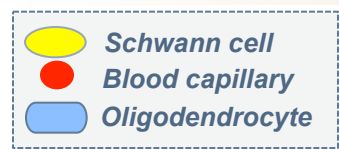
Schafer, M. et al., Eur J Pharmacol (1995)



Pertovaara, A. and Wei, H., Eur J Pharmacol (2001)

Roques, B.P., Fournié-Zaluski, M.C. and Wurm, M., NRDD (2012)

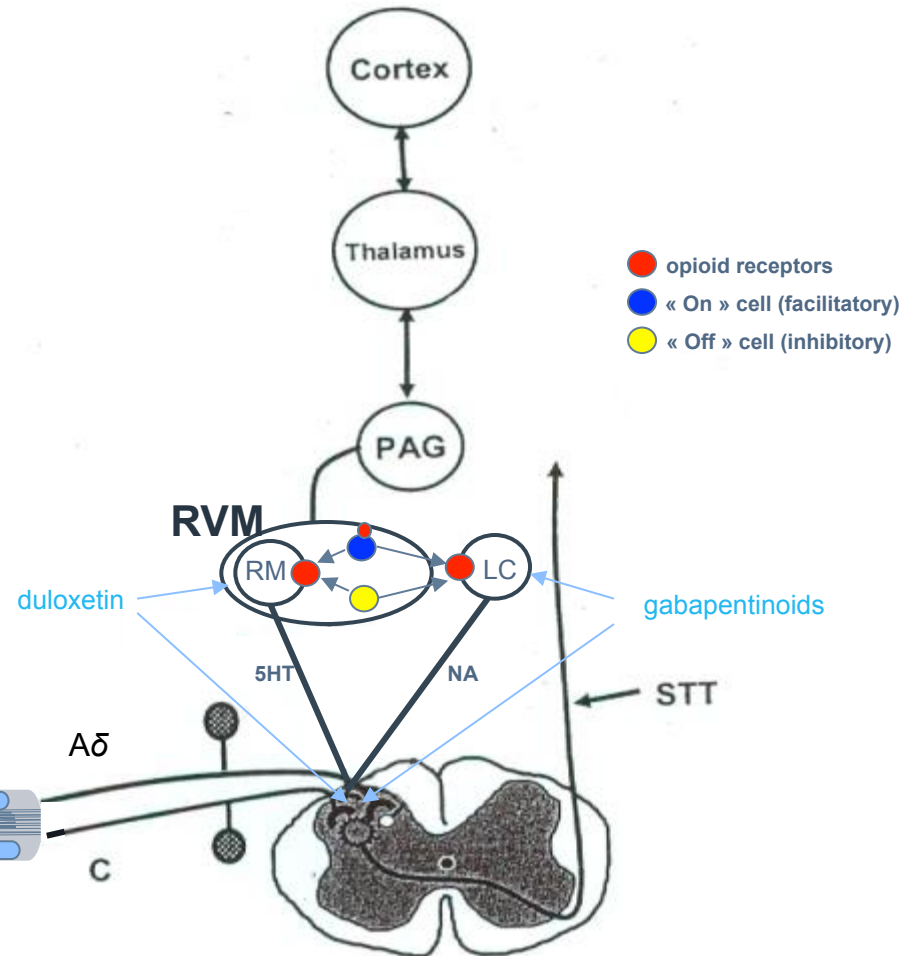
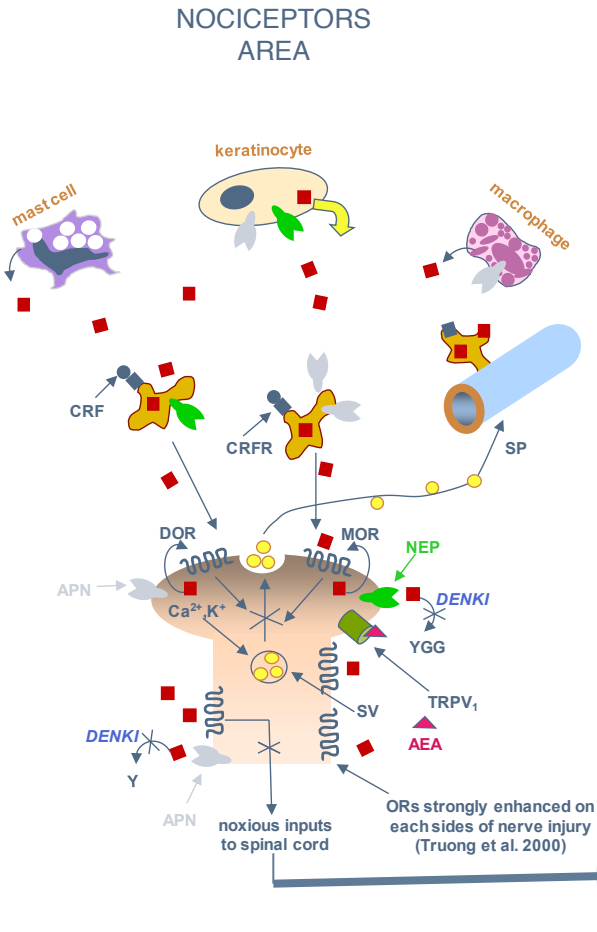
EOS and neuropathic pain



Action des opioïdes exogènes (ex MO) et endogènes (ENKs) dans la douleur neuropathique

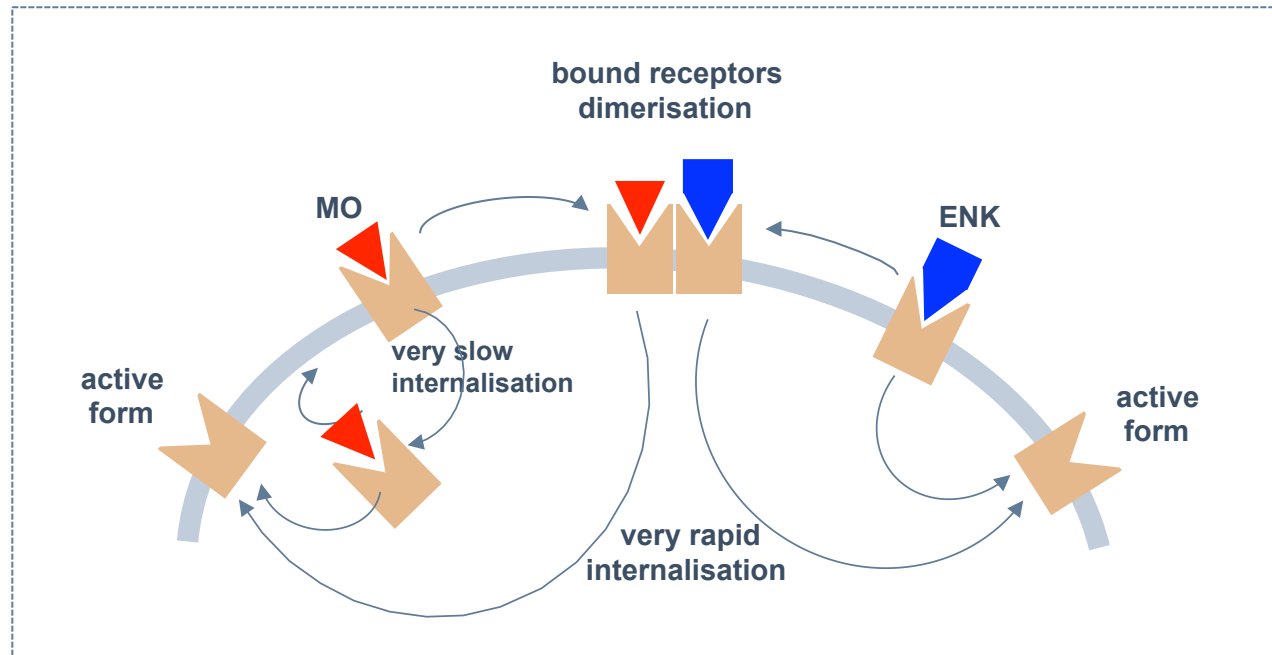
- In models of neuropathic (CCI in rodents) and inflammatory pain, release and concentration of enkephalins increase constantly during a week or two before plateauing for as long as the injury lasts (Zollner et al. 2008)

- In NP, oral opiates act centrally and facilitate pain by activating descending pathways
- In NP, oral DENKIs have no access to the CNS and therefore ENKs cannot activate descending pathways
- Moreover, tonic and phasic release of ENKs is weak in these structures



Trafficking of bound opioid receptors

Differences in the traffic and reinitialisation of active opioid receptors bound to ENKs or MO



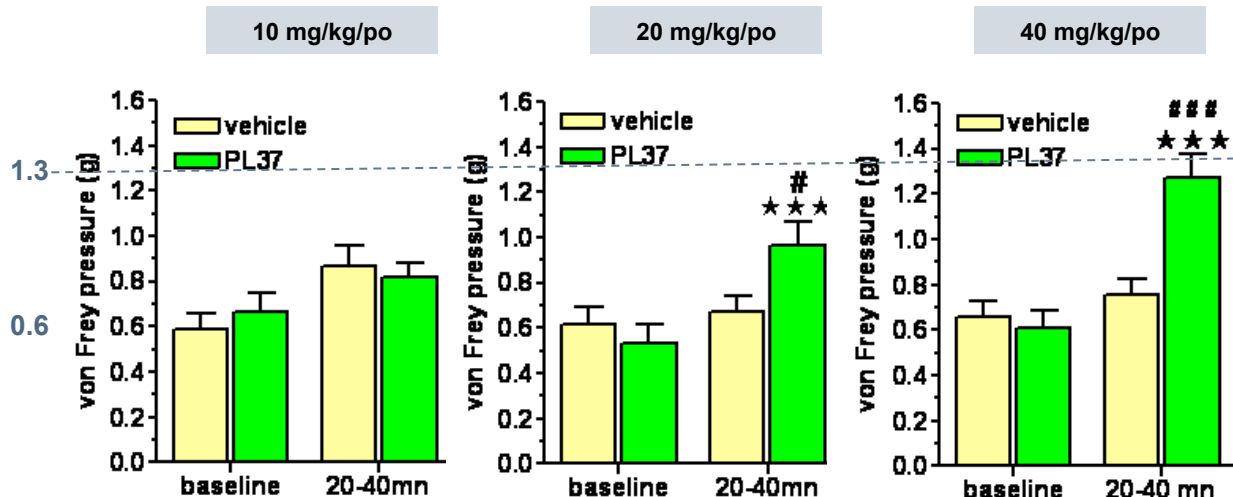
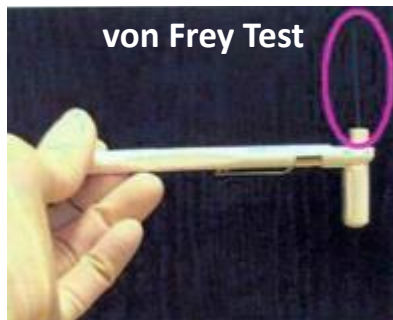
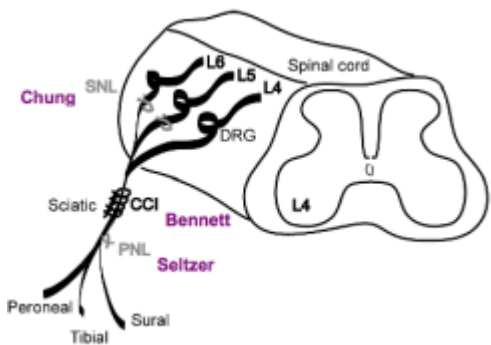
- MO-induced tolerance contrasting to its lack for DENKIs-protected ENKs.
- Decrease in MO-tolerance induced by DENKIs.
- Increase of analgesic response produced by combination of MO and ENKs

PL37 reduction of neuropathic pain (allodynia and thermal hyperalgesia) induced by partial ligation of sciatic nerve in mice

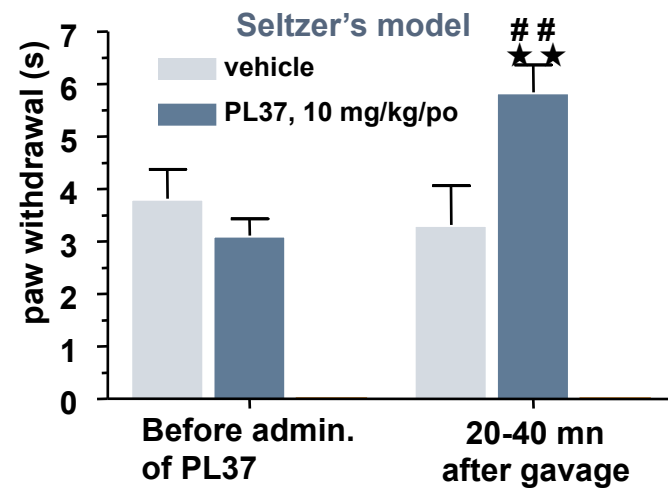
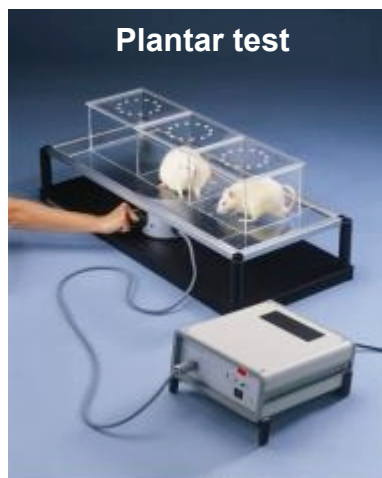


IPILATERAL, sham-operated

IPILATERAL, sciatic nerve injury



***p<0.001 versus baseline values; ###p<0.001, #p<0.05 versus vehicle (post injection). 2-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.



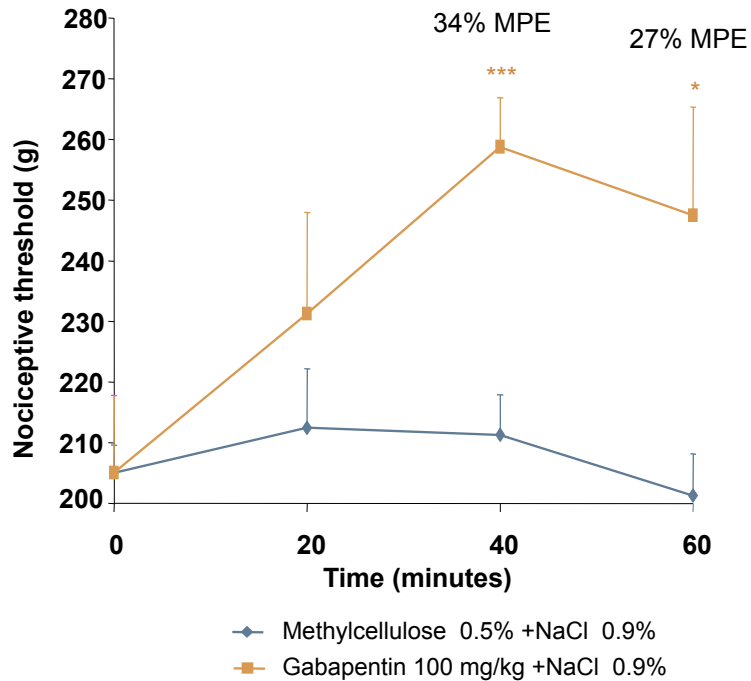
**p<0.001; *p<0.05 versus baseline values; ##p<0.01; #p<0.05 versus vehicle (post injection). 2 way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

The effect of PL37 is reversed by prior administration of naloxone methiodide (not shown here)

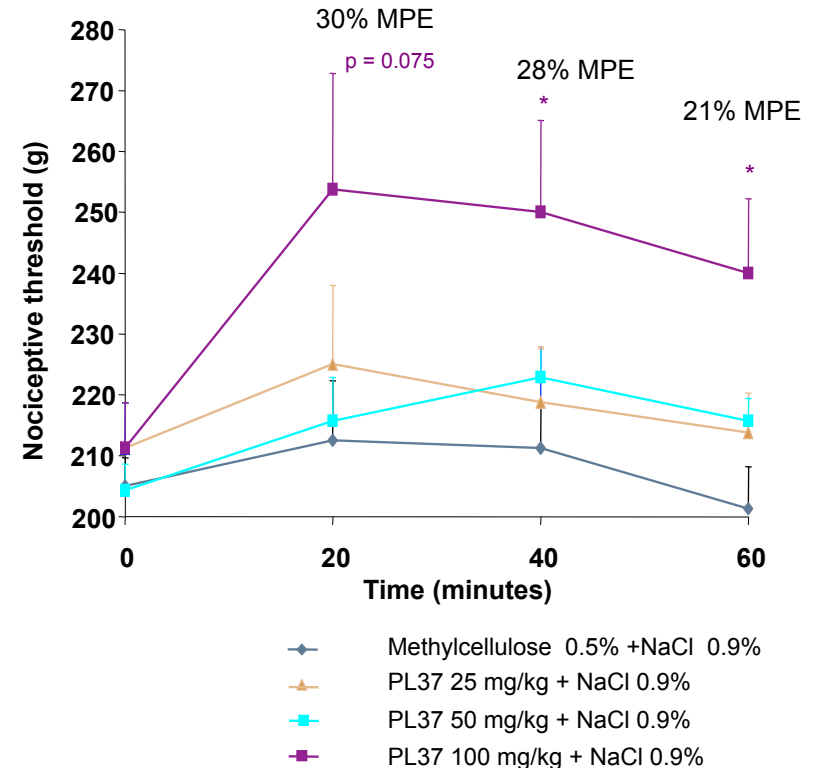
Effects of a single oral dose of PL37 and i.p. gabapentin on diabetic neuropathy in rats

Paw pressure test

Effect of gabapentin (100mg/kg, ip)



Effects of PL37 p.o



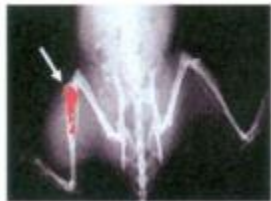
Student t test : *, **, *** indicates a significant difference in comparison with the value of the corresponding group at To on Day 21 for p < 0.05, p < 0.01, p < 0.001 respectively

Diabetic neuropathy in rats is induced by streptozotocin (STZ)

Synergistic antihyperalgesic effects of oral PL37 and gabapentin in murine tibial osteosarcoma

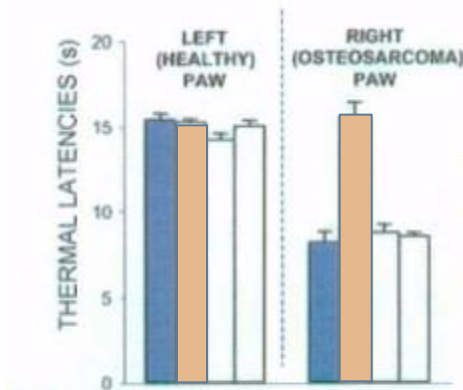
First demonstration of synergistic interaction between gabapentin and DENKI-protected endogenous opioids in neuropathic pain alleviation (thermal hyperalgesia).

Intratibial Tumor (osteosarcoma)



Mouse C3H/HeJ
10⁶ NCTC 2472 cells

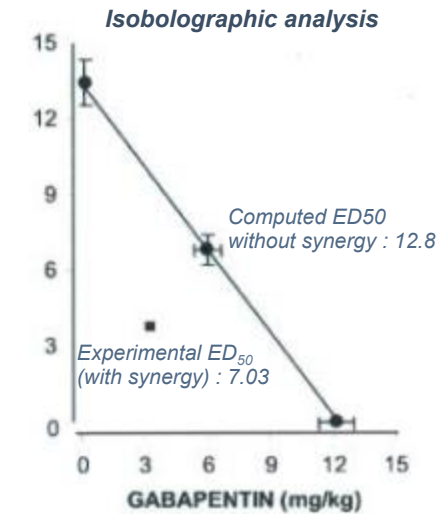
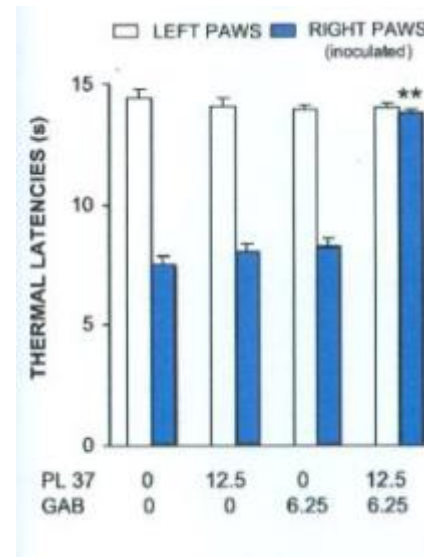
PL37 antihyperalgesic effect is reversed by naloxone methiodide.



PL37 - 25 - 25 - 25 - 25
NAL-MET - - 2 2 - - 2 2

Peripheral analgesia.

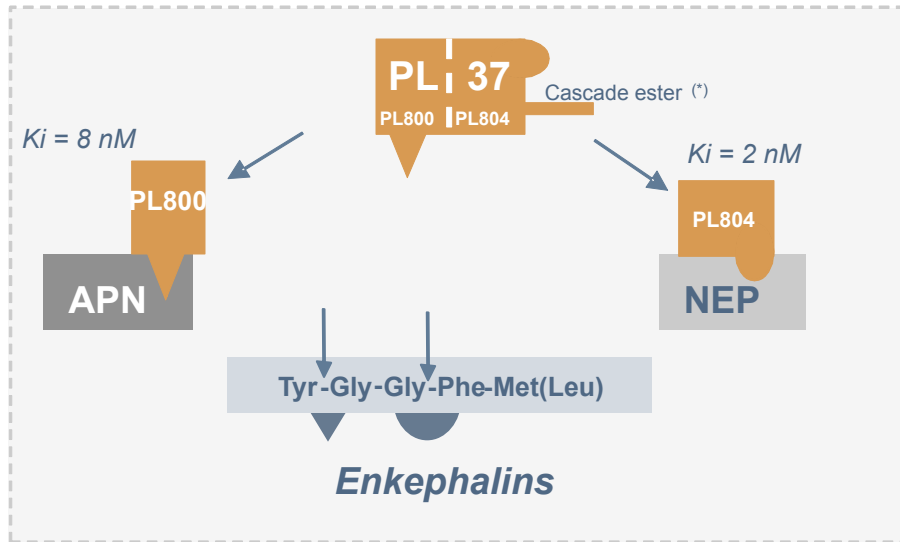
Synergistic effects of PL37 combined with gabapentin, both at subactive doses.



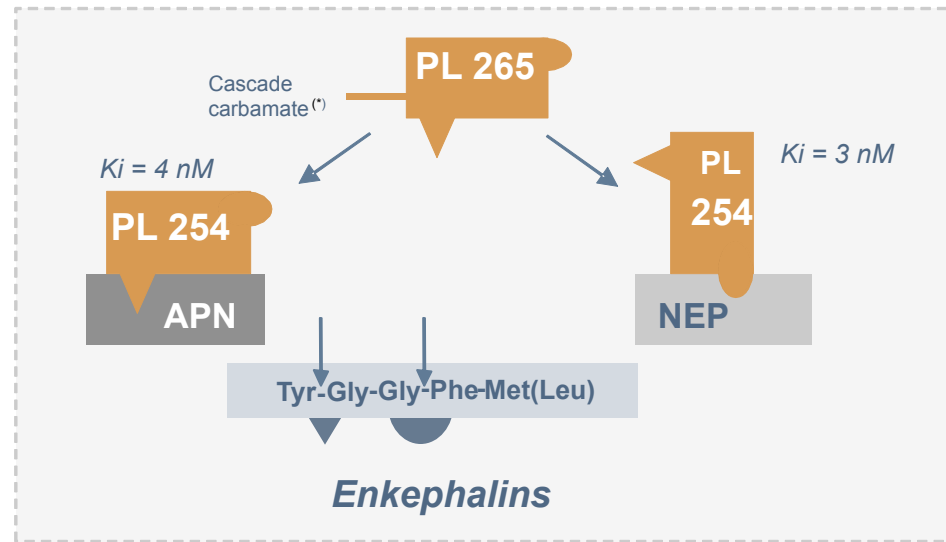
Menendez et al. Eur. J. Pharmacol., 2008

PL265 and gabapentin show the same synergistic effects in this model
Other synergistic effects are observed between PL37 or PL265 and P2X3R, CCKBR antagonists and CB2R agonists

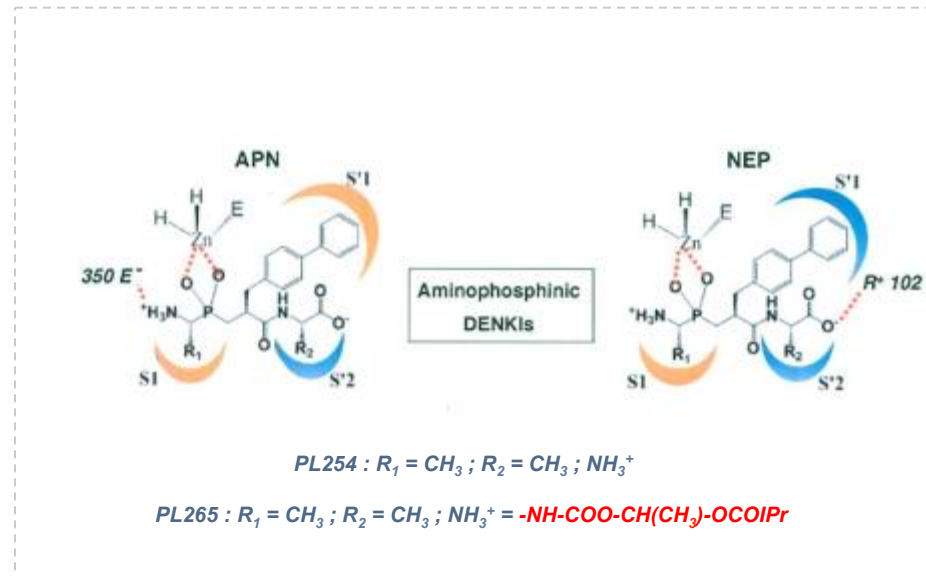
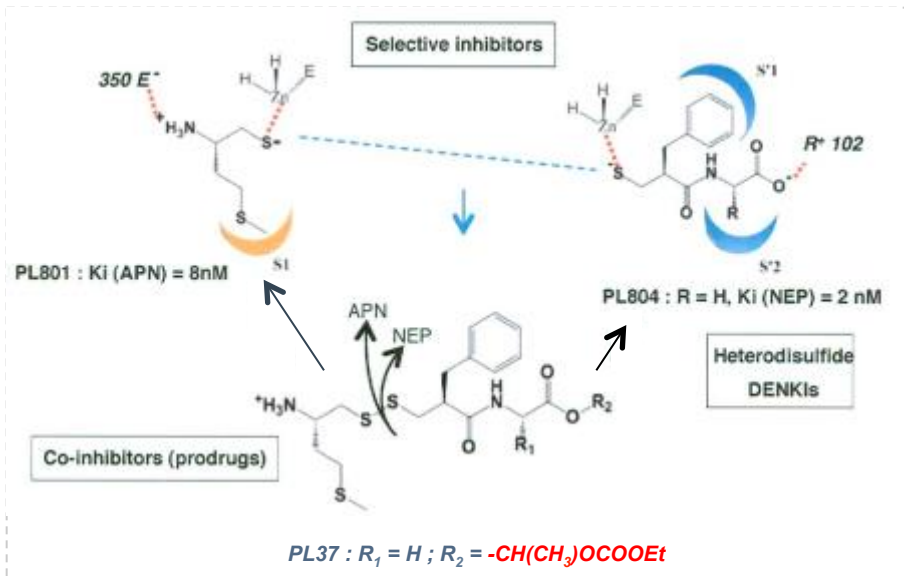
The two leading families of DENKIs



(*) Increases bio-availability



(*) Increases bio-availability





Les DENKIs n'induisent pas les effets indésirables produits par la morphine chez l'animal et chez l'homme

- Pas d'effet de dépression respiratoire
- Pas d'effet cardiovasculaire mesurable
- Pas de constipation, même après administration chronique
- Pas de tolérance après administration répétée
- Pas d'effet nauséeux chez le furet et le chien

Les résultats obtenus chez les rongeurs ont été retrouvés dans l'étude clinique de phase 1 (pharmacologie de sécurité). 136 sujets ont reçu PL37 orale dose unique à 6.25-1000 mg et multiples doses de 200-1000 mg 4 fois/jour pendant 5 jours.



De-risking development with DENKIs

Why are translational models more predictive with DENKIs than with other pain killers?

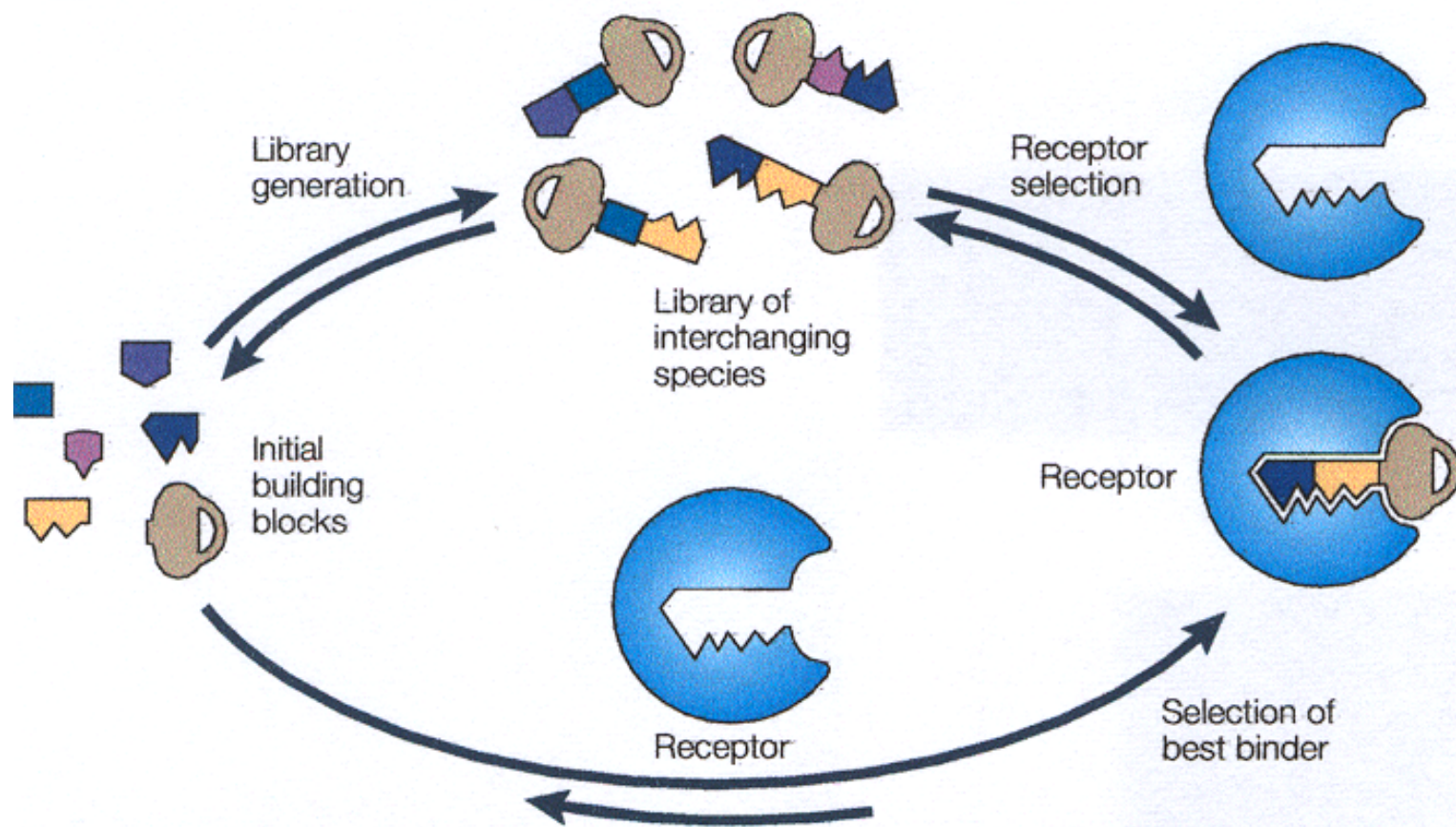
- The Endogenous Opioid System (EOS) – which is the sole target of DENKIs – plays a central role in pain control and is extraordinarily well preserved across species in particular between rodents and humans
- The EOS is present at all levels in pain control in all species: the sites of action of DENKIs are the same for rodents and humans
- The i.d. capsaicin test is considered a reliable predictive test in translational medicine from healthy volunteers to actual patients affected with neuropathic pain (NP), in particular on NP symptoms (allodynia, hyperalgesia)



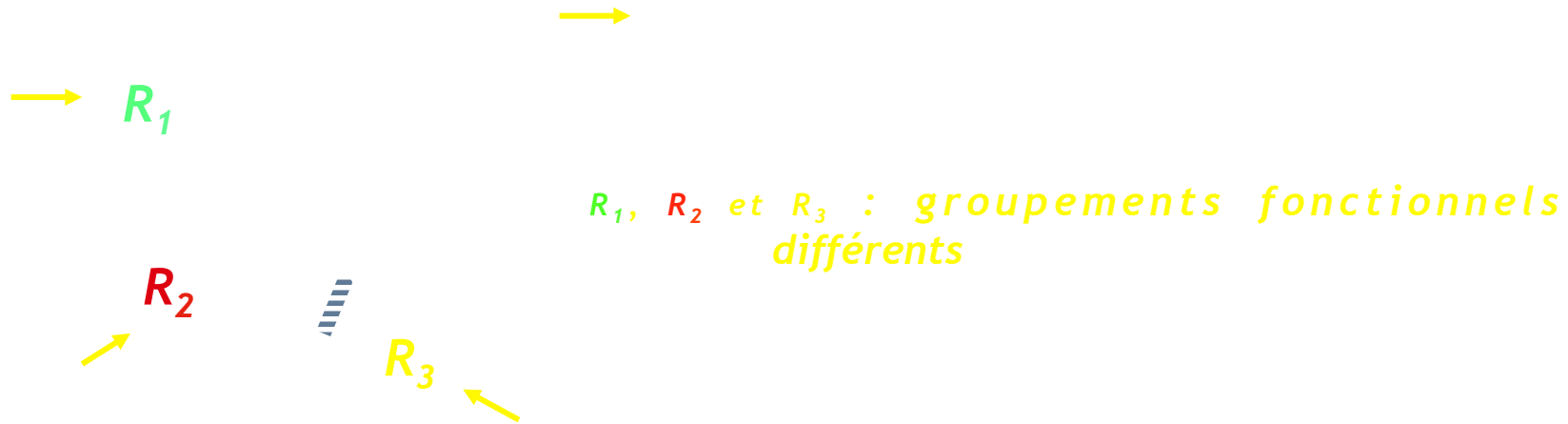
Conclusion on capsaicin test

- A significant effect was observed on all 4 parameters evaluated i.e. allodynia, mechanical hyperalgesia, flare intensity and area and global pain score (in the first ten minutes)
- Significant effects on allodynia and mechanical hyperalgesia were detected after 4 days of treatment, which is consistent with the mechanism of action of DENKIs in chronic pain (allowing for the increase of enkephalin concentrations), even with a short stimulus like capsaicin i.d. injection
- The observed magnitude of these effects favorably compares with those of gabapentin and pregabalin in comparable conditions
 - Gottrup H, et al. *Chronic oral gabapentin reduces elements of central sensitization in human experimental hyperalgesia*. Anesthesiology. 2004. **101**, pp 1400-8
 - Wallace MS and Schulteis G. *Effect of chronic oral gabapentin on capsaicin-induced pain and hyperalgesia*. Clin J Pain.. 2008. **6**, pp 544-9
 - Wang H. et al. *Effect of morphine and pregabalin compared with diphenhydramine hydrochloride and placebo on hyperalgesia and allodynia induces by intradermal capsaicin in healthy male subjects*. J Pain. 2008. **9**, pp 1088-95

Combinatorial chemistry and virtual combinatorial libraries : Schematic representation of the concept



La synthèse combinatoire organique



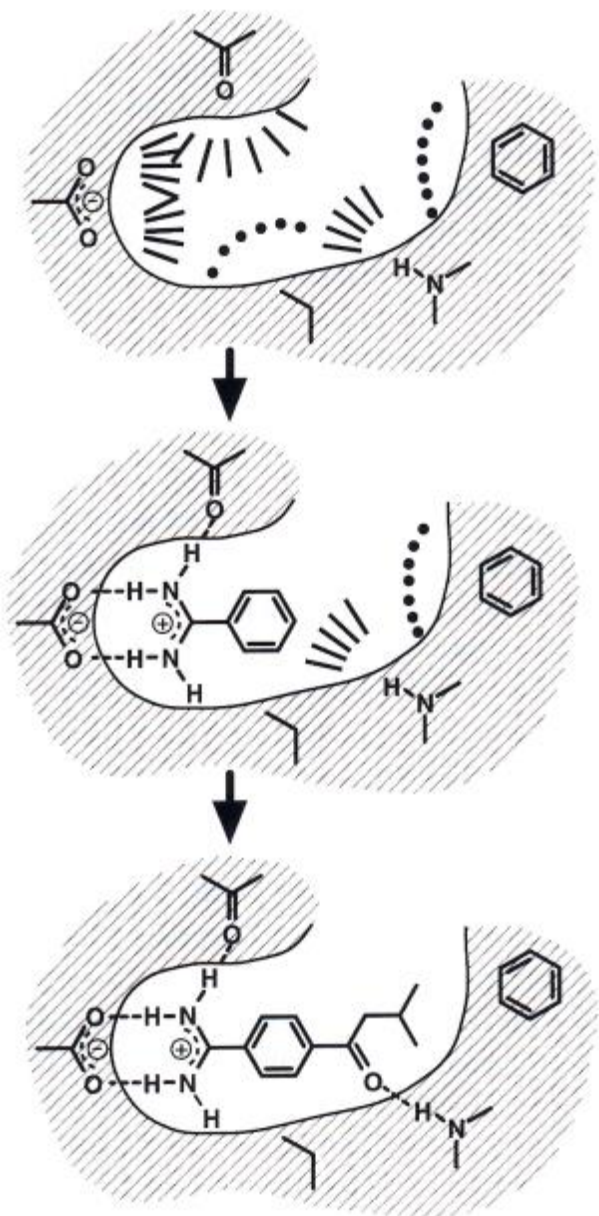
Possibilités :

Synthèse simultanée en parallèle de molécules uniques

→ *ROBOTISATION =*

→ *HTS*

DE NOVO DESIGN Principe -



STRUCTURE DE LA PROTEINE

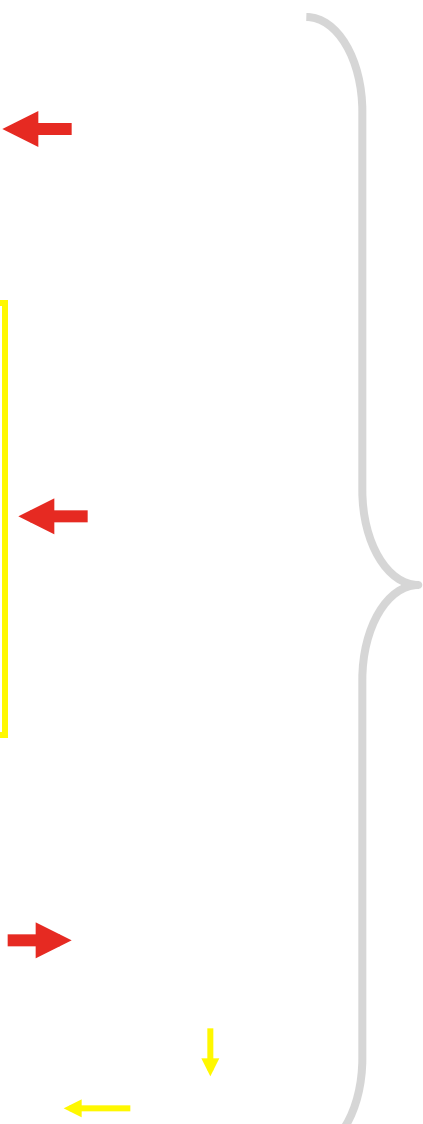
Docking des groupes fonctionnels

Connexion des groupes fonctionnels placés de manière optimale dans la protéine cible

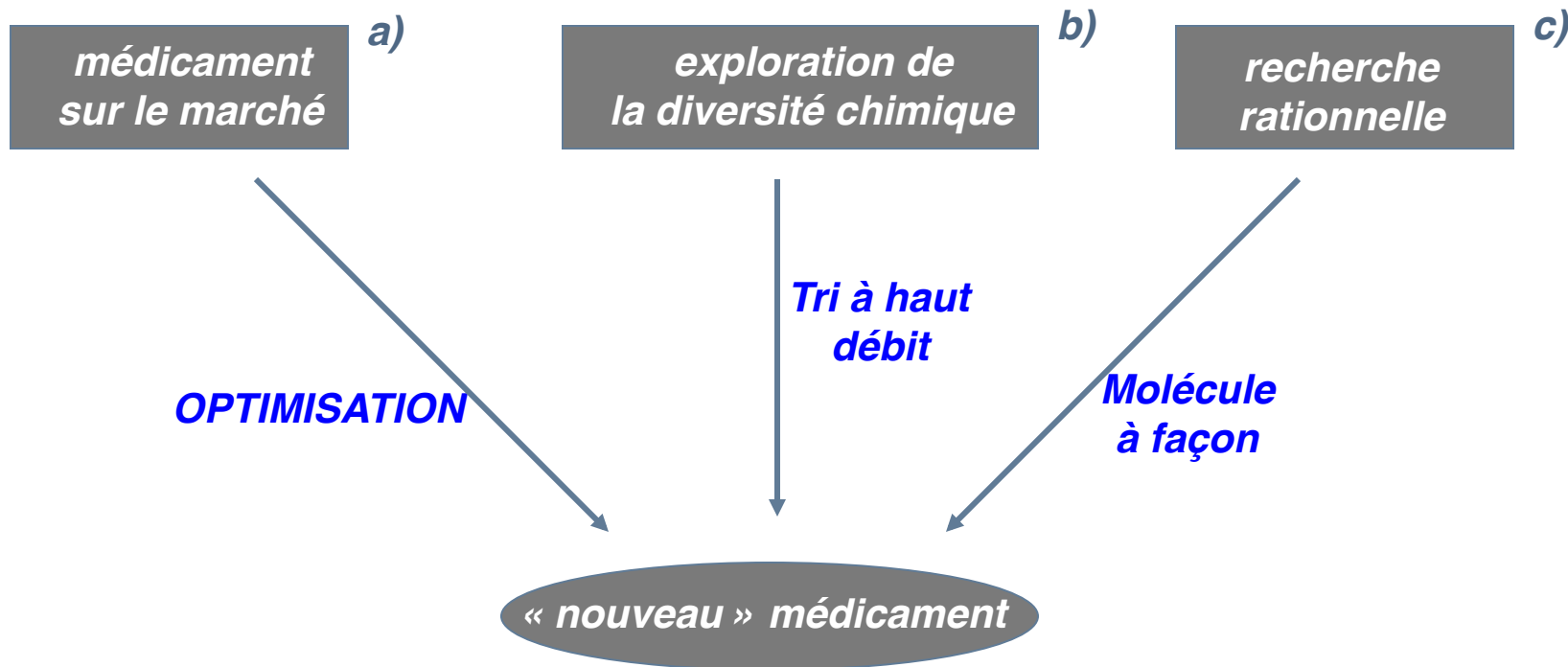
Estimation de l'énergie de liaison

Intérêts :

Problèmes :



Les stratégies classiques de la recherche thérapeutique.



**Originalité : a) faible
b-c) moyenne à grande.**

**Exemple : Cancer : a) taxanes : taxol → taxotène → BMΣ 27- 5183
b-c) Glivec, Iressa (TK I)
c) Herceptin-like-peptide.**

Les « big pharma » en panne de créativité

Nombre de nouvelles molécules
homologuées par la Food and Drug Administration

Compagnie	1998	1999	2000	2001	2002	2003
Pfizer	1	1	-	1	2	1
Johnson & Johnson	-	-	-	-	-	-
Merck	4	1	-	2	-	1
GlaxoSmithKline	2	2	1	1	-	-
Novartis			3	4	1	-
Amgen	-	-	-	-	-	-
Eli Lilly & Co.	-	-	-	-	1	1
AstraZeneca	1	-	-	-	1	2
Abbott Laboratories	2	-	1	-	-	-
Wyeth	-	2	2	-	-	-
TOTAL	10	6	7	8	5	5

Les Echos - lundi 5 juillet 2004

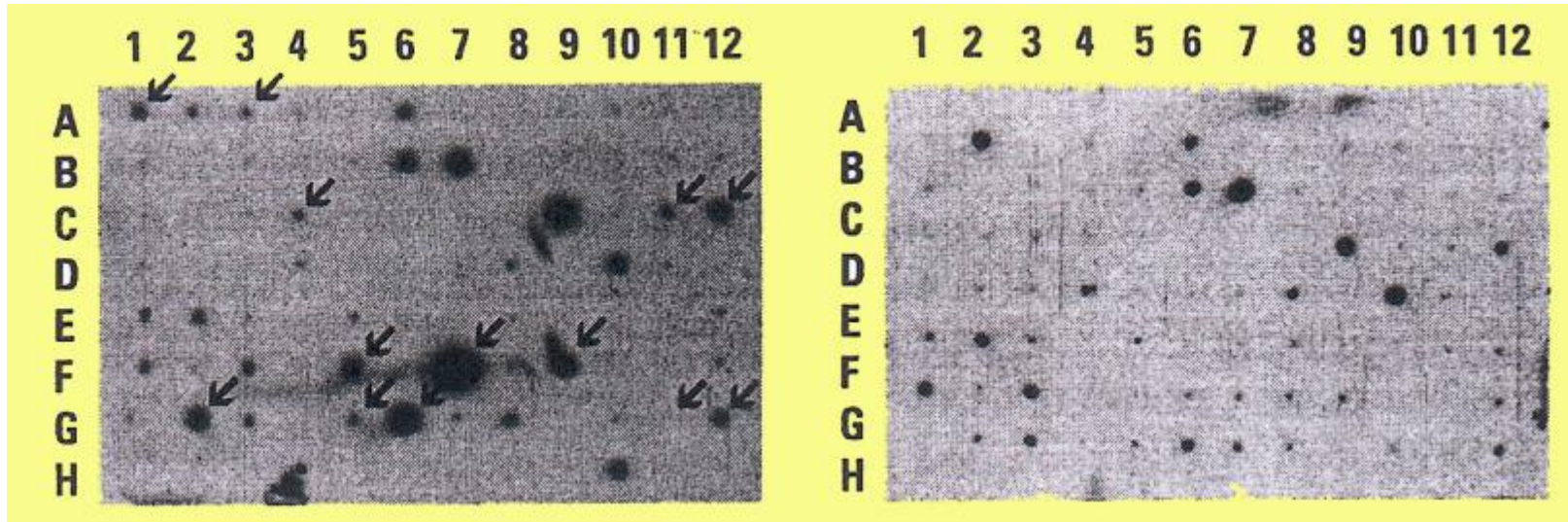
Avec le décodage du génome humain et plus généralement l'explosion des techniques de génomique et protéique on espérait une accélération dans la découverte de nouveaux médicaments majeurs (blockbusters) et finalement l'accès à une médecine personnalisée grâce à la pharmacogénomique. En fait les exemples de RD sont rares :

- *Herceptin® et Glivec® pour la leucémie myéloïde chronique, Iressa®, inhibiteur de EGFR (cancer poumon).*
- *Quelques anticorps monoclonaux en oncologie.*
- *Molécules anti-SIDA (protéase).*
- *Médicaments contre l'hyperactivité pathologique.*
-

Quel est le problème ! *Trop de cibles ! Interagissent entre elles ! Chercher l'étape limitante ?*

BANQUES SOUSTRACTIVES ET VARIATION GENIQUE EN THERAPEUTIQUE

Ex. Modèle d'arthrite rhumatoïde chez le rat.



24 gènes surexprimés + 12 gènes sousexprimés. (dont 9 gènes nouveaux)

Expression protéine(s) cible(s) potentielle(s)

